

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Preventiva



IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN DE
BIOPELÍCULA EN INFECCIONES
PROTÉSICAS CAUSADAS POR
Staphylococcus sp.
IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS.

TESIS DOCTORAL

Diana Molina Manso

Director: Jaime Esteban Moreno

Madrid, 2013

RELACIÓN DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON LA TESIS

PUBLICACIONES

1. Esteban J., **Molina-Manso D.**, Spiliopoulou I., Cordero J., Fernández-Roblas R., Foka A., Gómez-Barrena E. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* sp. from retrieved orthopaedic prosthesis. *Acta Orthop.* 2010 Dec; 81(6):674-9.
2. Esteban J., **Molina-Manso D.**, Del Prado G., Gómez-Barrena E. Molecular diagnosis of prosthetic joint infection. En: Biomaterials associated infection. Editor Rihard Trebse. Publisher Springer Verlag. Berlin, Alemania. Capítulo 19, pág. 193-211.
3. Esteban J., Alonso-Rodriguez N., Sandoval E., del-Prado G., Ortiz-Perez A., **Molina-Manso D.**, Cordero-Ampuero J., Fernández-Roblas R., Gómez-Barrena E. The etiological diagnosis of orthopaedic implant-related infection is improved by using sonication and PCR-hybridization after sonication. *Acta Orthop.* 2012 Jun; 83(3):299-304.
4. **Molina-Manso D.**, Manzano M., Doadrio JC., Del Prado G., Ortiz A., Vallet-Regí M., Gómez-Barrena E., Esteban J. Usefulness of SBA-15 mesoporous ceramics as a delivery system for vancomycin, rifampin and linezolid. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Sep; 40(3):252-6.
5. **Molina-Manso D.**, del Prado G., Ortiz-Pérez A., Manrubia-Cobo M., Gómez-Barrena E., Cordero-Ampuero J., Esteban J. *In vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections. *J Antibiot (Tokyo).* 2012 Oct; 65 (10):505-8.

6. **Molina-Manso D.**, del Prado G., Ortiz-Pérez A., Manrubia-Cobo M., Gómez-Barrena E., Cordero-Ampuero J., Esteban J. *In vitro* susceptibility to antibiotics in biofilms of staphylococci isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jun; 41(6):521-3.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. Esteban J., **Molina-Manso D.**, Martín-de-hijas N., García-Almeida D., Fernández-Roblas R., Cordero J., Gómez-Barrena E. *Detection of biofilm formation in staphylococcal isolates from retrieved orthopaedics implants*. Comunicación oral en 17th *Annual Meeting of European Orthopaedic Research Society (EORS)*. Madrid 24-26 Abril 2008.
2. Manzano M., **Molina-Manso D.**, Alonso-Rodríguez N., Esteban J., Doadrio JC., Gómez-Barrena E., Vallet-Regí M. *Antibiotic releasing from mesoporous ceramics: local delivery in bone infections*. Comunicación oral en 23th *European Conference of Biomaterials (ESB)*. Tampere, Finlandia. 11-15 Septiembre 2010.
3. Esteban J., Alonso-Rodríguez N., Cordero-Ampuero J., Sandoval E., Ortiz-Pérez A., del Prado G., **Molina-Manso D.**, Gómez-Barrena E. *Diagnosis of orthopaedic biomaterial-related infection using sonication of retrieved prosthesis and PCR-hybridization assay*. Comunicación oral en 7th *Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies (CORS)*. Kyoto, Japón. 16-20 Octubre de 2010.
4. **Molina-Manso D.**, Del Prado G., Manrubia-Cobo M., Ortiz-Pérez A., Cordero-Ampuero J., Gómez-Barrena E., Esteban J. *In vitro* antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from retrieved prosthetic implants. Comunicación oral en 24th

Annual Meeting International Society for Technology in Arthroplasty (ISTA). Brujas, Bélgica. 20-23 Septiembre 2011.

5. **Molina-Manso D.**, Del Prado G., Ortiz-Pérez A., Manrubia-Cobo M., Gómez- Barrena E., Cordero-Ampuero J., Esteban J. *Estudio preliminar de sensibilidad in vitro a antibióticos en biopelículas de estafilococos aislados de infecciones ortoprotésicas*". Comunicación oral en XXIV Reunión de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología (SAMPAC). Sevilla, España. 10-11 Noviembre 2011.
6. **Molina-Manso D.**, Del Prado G., Ortiz-Pérez A., Manrubia-Cobo M., Gómez- Barrena E., Cordero-Ampuero J., Esteban J. *In vitro susceptibility to antibiotics in biofilms of staphylococci isolated from orthopaedic infections*. Comunicación oral en 20th *Annual Meeting of the European Orthopaedic Research Societies (EORS)*. Amsterdam, Holanda. 26-28 Septiembre 2012.
7. **Molina-Manso D.**, Del Prado G., Lucas-Díaz M., Gómez-Barrena E., Cordero-Ampuero J., Esteban J. *Effect of N-Acetylcysteine and subinhibitory concentrations of erythromycin in combination with antibiotics in staphylococcal biofilms isolated from orthopaedic infections. A preliminary study*. Comunicación oral en 8th *Combined Meeting of Orthopaedic Research Society (CORS)*. Venecia, Italia. 13-16 Octubre 2013.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director de tesis, Jaime Esteban, por acogerme en el laboratorio, enseñarme el mundo de los *biofilms* y permitirme la realización de esta tesis.

También quiero dar las gracias a mi tutor, Ignacio Gadea, así como a todas las personas del departamento de Microbiología de la FJD a las que he conocido durante mi paso por el hospital, en especial a Carol, Moncho y Afri, por compartir un poquito de nuestro día a día de forma más cercana.

A la Fundación Conchita Rábago, por la financiación recibida durante la mayor parte del desarrollo de esta tesis. Del mismo modo, agradezco la financiación recibida por parte del Ministerio de Educación y Ciencia a través del Proyecto FUNCOAT-CONSOLIDER-CSD2008-00023 y por parte de la Comunidad de Madrid a través del Proyecto BITI - S2009/MAT-1472-1.

Al personal de investigación, pedidos y auxiliares del IIS-FJD que hace posible que podamos realizar nuestro trabajo cada día. A Curra, por esas mañanas interminables de confocal, pero que se llevan mejor si estás bien acompañada; a Nacho, por su ayuda con la estadística y su simpatía, a Carlos del animalario, por Brownie y tantos más, y a Oliver, porque gracias a su ayuda salí airosa de los congresos.

A los chicos del departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, en especial a Miguel, Montse, Sandra y Alejandra por recibirme siempre con una sonrisa y ayudarme en todo lo que estaba en su mano; y por supuesto a María Vallet-Regí por el proyecto de las biocerámicas.

Volviendo a la FJD, no puedo dejar de dar las gracias a todos los compañeros con los que he tenido la oportunidad de coincidir en estos años. Soy de la opinión de que cada persona con la que uno se cruza en la vida nos deja algo. De todos y cada uno he sacado un poquito. Los chicos de Metabolismo Mineral y Óseo, en especial a Martita y Adela; del laboratorio de Lípidos: Ali, por ser tan auténtica y alegre siempre, a pesar de las adversidades siempre sacas esa sonrisa que te caracteriza, ¡y por los mojitos y los tintos!;

Lorena, por ser siempre tan sincera y compartir conmigo tu amor por la danza, y la recién llegada Pili , ¡te deseo suerte! Del laboratorio de Hematología: Vane, por tantas confidencias compartidas; Irene, ¡gracias por venirme al lado oscuro del pasillo! y Aran, por ese corazón que no te cabe en el pecho, ¡y por bailar tan bien oriental!

Y a mis compañeros de batallas (como dice alguien muy sabio...) desde los inicios hasta el final de esta etapa: Nieves, David, Alberto, Noelia, Miguel. De todos he aprendido algo, tanto laboral como personalmente; A María, por los momentos Antonio, las reuniones sin bata y porque sé que algún día me gustará el vino por tu culpa, que consigues todo lo que te propones. Llegarás lejos, de eso estoy segura; y por último, Gemi, no he conocido a nadie con tanta bondad y paciencia, gracias por tu cariño, tus ánimos y por ser la compañera que todos quisieran tener, yo he tenido esa suerte.

Y como hay vida más allá del laboratorio, llega el turno de mi cara B.

A las personas que conocen mi lado más auténtico, porque sin mis clascitas no soy yo al 100%. A Angelika, por todo lo vivido y lo que espero nos quede por vivir, por ser más que una maestra y por tantas cosas...No hacen falta palabras. A la gente que comparte conmigo esa locura por la danza: Mariela, Jorge, etc. Creo que no hace falta decir nada más.

A mis chicas “decididas”, Almu, Inma y María, porque pase lo que pase, se que siempre estarán ahí. Gracias por todo.

A mi familia, por conocerme como realmente soy y apoyarme siempre en todo lo que hago. Sin ellos no sería nada, ni mucho menos habría llegado hasta aquí.

Y a Quique. Por aparecer en mi vida desde hace más de 10 años y quedarte. Por estar presente en cada cosa que hago y ayudarme (sobre todo en estos últimos días....), por esta nueva etapa que acabamos de comenzar tras mucha espera, y por lo que nos queda...

Todos y cada uno formáis parte de esto. ¡GRACIAS!

A mi familia.

A Quique.

A J.W. Costerton (1934-2012), por su innegable
contribución a la Microbiología.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES ORTOPÉDICOS.....	3
1.1.1. PRÓTESIS OSTEOARTICULARES.....	4
1.1.1.1. <i>Presentación clínica, clasificación y etiología</i>	5
1.1.2. MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS.....	8
1.1.2.1. <i>Presentación clínica, clasificación y etiología</i>	9
1.2. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES ORTOPÉDICOS	11
1.3. PATOGENIA DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES ORTOPÉDICOS	14
1.3.1. BIOPELÍCULAS.....	16
1.3.1.1. <i>Definición</i>	16
1.3.1.2. <i>Características y propiedades</i>	17
1.3.2. <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SP. Y BIOPELÍCULAS.....	20
1.4. TRATAMIENTO	25
1.4.1. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES PROTÉSICAS.....	26
1.4.2. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS.....	28
1.4.3. ANTIBIOTERAPIA.....	30
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	41
3.2. EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COMERCIAL DE PCR-HIBRIDACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN.....	43
3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULA	45
3.3.1. CEPAS.....	45
3.3.2. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LOS GENES <i>ica A</i> , <i>ica D</i> e <i>ica R</i> POR PCR....	47
3.3.3. TEST EN PLACAS MULTIPOCILLO (MtP)	50
3.3.4. TEST DE STEPANOVIC.....	51
3.3.5. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL (CLSM)	52
3.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53

3.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	53
3.4.1. CEPAS.....	53
3.4.2. ANTIMICROBIANOS	53
3.4.3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BACTERIAS PLANCTÓNICAS	54
3.4.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BIOPELÍCULAS.....	56
3.4.4.1. <i>Estudios con un solo compuesto</i>	56
3.4.4.2. <i>Estudios con combinación de compuestos</i>	58
3.5. ENSAYO CON PÉPTIDO INHIBIDOR DEL <i>QUORUM SENSING</i>	59
3.6. BIOCERÁMICAS MESOPOROSAS COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS	59
3.6.1. CARGA DE ANTIBIÓTICOS EN LAS MATRICES SBA-15	60
3.6.2. LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS DESDE LAS MATRICES SBA-15 Y MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LIBERADA	62
3.6.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANTIBIÓTICO LIBERADO....	63
4. RESULTADOS	65
4.1. EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COMERCIAL DE PCR-HIBRIDACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	67
4.1.1. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.....	69
4.1.2. PRÓTESIS ARTICULARES.....	72
4.1.3. MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS Y CLAVOS.....	73
4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULA	74
4.2.1. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LOS GENES <i>ica A</i> , <i>ica D</i> e <i>ica R</i> POR PCR...	75
4.2.2. TEST MtP	75
4.2.3. TEST DE STEPANOVIC.....	76
4.2.4. CLSM	77
4.3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	81
4.3.1. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BACTERIAS PLANCTÓNICAS	81
4.3.2. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BIOPELÍCULAS.....	86
4.3.2.1. <i>Estudios con un solo compuesto</i>	86
4.3.2.2. <i>Estudios con combinación de compuestos</i>	87
4.4. ENSAYO CON PÉPTIDO INHIBIDOR DEL <i>QUORUM SENSING</i>	100
4.5. BIOCERÁMICAS MESOPOROSAS COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS	101
4.5.1. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE ANTIBIÓTICO LIBERADO	101

4.5.2.MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANTIBIÓTICO LIBERADO
103

5. DISCUSIÓN	105
6. CONCLUSIONES	133
7. BIBLIOGRAFÍA.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Infección de prótesis de rodilla.....	5
Figura 2.	Infección de material de osteosíntesis en una fractura de tibia.....	9
Figura 3.	Proceso de formación de una biopelícula.	18
Figura 4.	Imagen al microscopio electrónico de barrido de <i>S. aureus</i>	24
Figura 5.	. Muestras de una tira de nitrocelulosa.	45
Figura 6.	Detalle de una placa “MBEC® device”.	56
Figura 7.	Esquema de carga con las distintas combinaciones de antibióticos en las piezas de SBA-15.	61
Figura 8.	Observación por CLSM de la biopelícula formada por la cepa P- 1 (<i>S. aureus</i>)	78
Figura 9.	Observación por CLSM de la de la biopelícula formada por la cepa P-33.1 (<i>S.epidermidis</i>)	78
Figura 10.	Observación por CLSM de la cepa P-61T4 (<i>S.aureus</i>), negativa para la formación de biopelícula.....	79
Figura 11.	Observación por CLSM de la cepa P-74 (<i>S.epidermidis</i>), negativa para la formación de biopelícula	79
Figura 12.	Gráficas de liberación individual de vancomicina (a) y linezolid (b). ..	101
Figura 13.	Gráfica de liberación conjunta de los tres antibióticos.	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Condiciones de la amplificación por PCR.	44
Tabla 2.	Origen de las cepas clínicas de estudio.	46
Tabla 3.	Condiciones de la amplificación por PCR	50
Tabla 4.	Comparación de los resultados obtenidos mediante cultivo y PCR-hibridación.	68
Tabla 5.	Especies aisladas mediante cultivo convencional.	70
Tabla 6.	Especies detectadas mediante el sistema de PCR-hibridación.	71
Tabla 7.	Resultados obtenidos para los pacientes según el tipo de implante con ambas técnicas.	73
Tabla 8.	Resultados obtenidos para los pacientes según el diagnóstico clínico.	74
Tabla 9.	Resultados obtenidos en el estudio de formación de biopelícula en las cepas de <i>S. aureus</i>	80
Tabla 10.	Resultados obtenidos en el estudio de formación de biopelícula en las cepas de <i>S. epidermidis</i>	80
Tabla 11.	Datos de CMI obtenidos en el estudio de sensibilidad para NAC y eritromicina.	83
Tabla 12.	Resultados del estudio de sensibilidad en las cepas de <i>S. aureus</i>	84
Tabla 13.	Resultados del estudio de sensibilidad en las cepas de <i>S. epidermidis</i>	85
Tabla 14.	Resultados del estudio de sensibilidad en biopelículas.	87
Tabla 15.	Resultados del estudio de sensibilidad en biopelículas para las combinaciones de antibióticos con NAC y eritromicina en <i>S. aureus</i>	88
Tabla 16.	Resultados del estudio de sensibilidad en biopelículas para las combinaciones de antibióticos con NAC y eritromicina en <i>S. epidermidis</i>	89
Tabla 17.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. aureus</i> (I).	90
Tabla 18.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. aureus</i> (II).	91
Tabla 19.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. aureus</i> (III).	92

Tabla 20.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. aureus</i> (IV).....	93
Tabla 21.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. aureus</i> (V).	94
Tabla 22.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. epidermidis</i> (I). ..	95
Tabla 23.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. epidermidis</i> (II).	96
Tabla 24.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. epidermidis</i> (III).	97
Tabla 25.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. epidermidis</i> (IV).	98
Tabla 26.	Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en <i>S. epidermidis</i> (V).	99
Tabla 27.	Resultados obtenidos en los ensayos con el péptido <i>RIP</i>	100
Tabla 28.	Resultados globales del estudio de liberación de antibióticos.....	104

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosómico

BGN: Bacilos Gram negativos

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLSM: Microscopía laser confocal (*Confocal Laser Scanning Microscopy*)

CMB: Concentración Mínima Bactericida

CMEB: Concentración Mínima de erradicación de la biopelícula

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMI₅₀: Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe al 50% de las cepas

CMI₉₀: Concentración Mínima Inhibitoria que inhibe al 90% de las cepas

D.O.: Densidad óptica

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión (*High-pressure Liquid Chromatography*)

IPA: Infección de prótesis articular

MH-II: Caldo Muller-Hinton II

MtP: Test en placa multipocillo (*Microtiter plate assay*)

NAC: N-Acetilcisteína

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PIA: Polisacárido de adhesión intercelular (*Polysaccharide Intercellular Adhesin*)

QS: *Quorum sensing*

QSI: Inhibidor del *quorum sensing*

RIP: Péptido inhibidor de RNA III (*RNAIII Inhibiting Peptide*)

SAMR: *S. aureus* meticilín-resistente

SCN: Estafilococos coagulasa negativos

SCV: Variantes de colonia pequeña (*Small-colony variants*)

TSS: Agar Triptosa-Soja + 5% sangre de cordero

UFC: Unidades formadoras de colonia

1.INTRODUCCIÓN

1.1. INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES ORTOPÉDICOS

El empleo de biomateriales implantables ha supuesto un gran avance en la medicina del siglo XX, entendiéndose éstos como materiales de origen no biológico utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina, tales como metales, cerámicas o polímeros (1).

En el campo de la cirugía ortopédica, la utilización de implantes protésicos y material de osteosíntesis ha revolucionado de forma importante el tratamiento de múltiples enfermedades, mejorando de manera sustancial el manejo de los pacientes y facilitando de manera notable su curación. En la actualidad, un elevado número de pacientes es portador de una prótesis articular en los países desarrollados, y se estima que en España se realizan unas 70.000 artroplastias al año (2). Con respecto a los tratamientos de fracturas, hoy en día el mismo resulta inimaginable sin el empleo de implantes tales como fijadores externos, clavos intramedulares, tornillos o placas de fijación.

Sin embargo, a pesar de todas las ventajas que presenta su utilización, en ocasiones el empleo de estos implantes puede dar lugar a complicaciones. Se estima que entre el 2 y el 5% de los pacientes a los que se les coloca un implante protésico desarrolla algún tipo de complicación a lo largo de su vida (3), y con el envejecimiento progresivo de la población y el desarrollo tecnológico es de esperar que el número de complicaciones aumente de manera proporcional al aumento en el número de estas intervenciones (4).

1.1.1. PRÓTESIS OSTEOARTICULARES

Las dos principales complicaciones que pueden aparecer en pacientes sometidos a una artroplastia son el aflojamiento biomecánico aséptico y la infección (5). La movilización aséptica del implante suele ser la más frecuente, pero la más grave es la infección de la prótesis, ya que a menudo requiere largos y complejos tratamientos antibióticos, múltiples intervenciones quirúrgicas y hospitalizaciones prolongadas, con las correspondientes molestias que conlleva para el paciente y elevados gastos sanitarios (6-8).

En ocasiones es difícil distinguir ambas, ya que las manifestaciones clínicas pueden ser muy variables y no son siempre específicas de una infección. De hecho, algunos autores sugieren que muchos casos de aflojamiento aséptico podrían tratarse en realidad de infecciones subclínicas (9, 10). En todo caso, la discriminación entre el fallo séptico y aséptico es primordial con el fin de evitar tratamientos antimicrobianos innecesarios junto con otras molestias para el paciente como la hospitalización prolongada y la exposición a los riesgos que implica la cirugía. Por otra parte, el fallo en la detección de estas infecciones puede dar lugar a una infección persistente (11-13).

La prevalencia de este tipo de infecciones ha disminuido considerablemente en los últimos años. Gracias a las medidas preventivas adoptadas, como la profilaxis antibiótica y las medidas de asepsia aplicadas durante la cirugía, se ha pasado del 9% de los años 60 a estar actualmente en torno al 1% para las prótesis de cadera y alrededor del 2,5% en las de rodilla en artroplastias primarias, siendo este

porcentaje superior para artroplastias secundarias (14-16). A pesar de esta disminución, siguen representando una de las complicaciones más catastróficas en este tipo de cirugías.



a)



b)

Figura 1. Infección de prótesis de rodilla.

a) Radiografía lateral; b) Radiografía anteroposterior del mismo paciente.

1.1.1.1. Presentación clínica, clasificación y etiología

El tiempo que transcurre desde la contaminación bacteriana hasta la aparición de los síntomas es variable, apareciendo en su mayoría en los tres primeros meses desde la cirugía. Sin embargo, en ocasiones la infección puede permanecer latente y el diagnóstico se realiza meses e incluso años después de la colocación de la prótesis.

Actualmente la clasificación más aceptada de los cuadros de IPA es la de Tsukayama y cols. (17), que considera el tiempo de aparición de la infección desde

el momento de la cirugía de colocación de la prótesis. La clasificación es la siguiente:

- Infección post-quirúrgica precoz: Los síntomas de la infección aparecen en el primer mes desde la colocación de la prótesis. Se caracteriza por la aparición de los síntomas de manera aguda, con inflamación local de la articulación, dolor, signos de infección de la herida quirúrgica con supuración, y en ocasiones fiebre y celulitis.

- Infección post-quirúrgica tardía: Aparece después de los dos meses tras la cirugía, con síntomas como dolor y movilización de la prótesis, que puede dar lugar a confusión con un aflojamiento aséptico. En algunos casos puede darse la aparición de una fístula que comunica con la prótesis y, más excepcionalmente, fiebre.

- Algunos autores establecen una clasificación más entre las dos anteriores, la infección intermedia, que es aquella que se produce entre el segundo mes y los dos años tras la cirugía, probablemente causada por microorganismos poco virulentos que dan lugar a manifestaciones clínicas tardías. Sin embargo, dado que el manejo es prácticamente idéntico a la tardía, suele asimilarse con la anterior.

- Infección hematógena: Se asocia a una bacteriemia previa, y puede darse tanto de forma aguda como tardía, aunque suele dar lugar a la aparición de síntomas

agudos en la articulación afectada. El foco puede localizarse en distintas zonas anatómicas.

- Infección asociada a cultivos intraoperatorios positivos: Este tipo de infección suele definirse cuando el paciente muestra resultados positivos en el cultivo de las muestras tomadas durante una cirugía de revisión en la que no hay una sospecha clara de infección, por lo que suele tratarse de casos de infecciones subclínicas. Normalmente se descubren cuando ya se ha realizado el recambio de la prótesis. Es importante tener en cuenta la implicación clínica del resultado de esos cultivos, ya que debe diferenciarse de manera adecuada de potenciales casos de contaminación.

Respecto a la etiología de las IPA, los microorganismos responsables varían en función del tipo de prótesis, tiempo transcurrido tras la cirugía, factores de riesgo (inmunosupresión, diabetes, obesidad o edad muy avanzada) y localización de la prótesis. Sin embargo, a pesar de esta variabilidad, hay un claro predominio de los cocos Gram positivos, principalmente estafilococos, siendo los responsables de la mitad, o hasta dos terceras partes de estas infecciones (10, 18-24). Las infecciones causadas por BGN como *Pseudomonas aeruginosa* o enterococos representan aproximadamente el 6%, mientras que en el caso de los microorganismos anaerobios la proporción es más baja, del 2-4%, siendo el principal microorganismo responsable *Propionibacterium* sp (20).

En los casos de infección hematógena, el microorganismo dependerá del foco de infección como puede ser la piel (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*

pyogenes), catéteres (*Staphylococcus epidermidis*), manipulaciones odontológicas (*Streptococcus* sp. y anaerobios), infecciones urinarias o gastrointestinales (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, y anaerobios)(8). Las infecciones causadas por otro tipo de microorganismos, como hongos o micobacterias atípicas son menos habituales.

Además se estima que el 10-20% de las IPA son polimicrobianas y que sorprendentemente, entre el 7 y el 10% de casos, el resultado en el cultivo es negativo (20, 25, 26).

1.1.2. MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS

Al igual que sucede con las prótesis articulares, el uso de implantes como clavos intramedulares, placas de fijación o tornillos para el tratamiento de fracturas también presenta riesgo de infección. En este caso, el porcentaje es algo superior, variando del 3% al 25% en función del tipo de implante y de fractura, correspondiendo los porcentajes más bajos a clavos intramedulares y fracturas cerradas, y los porcentajes más altos a los casos de fijaciones externas y fracturas abiertas, como por ejemplo las fracturas tipo IIIB de Gustilo (27, 28). Por otro lado, al tener en cuenta las infecciones profundas los porcentajes son similares. Asimismo, también influyen en ese riesgo de infección el daño tisular, el grado de contaminación y la administración de antibióticos.

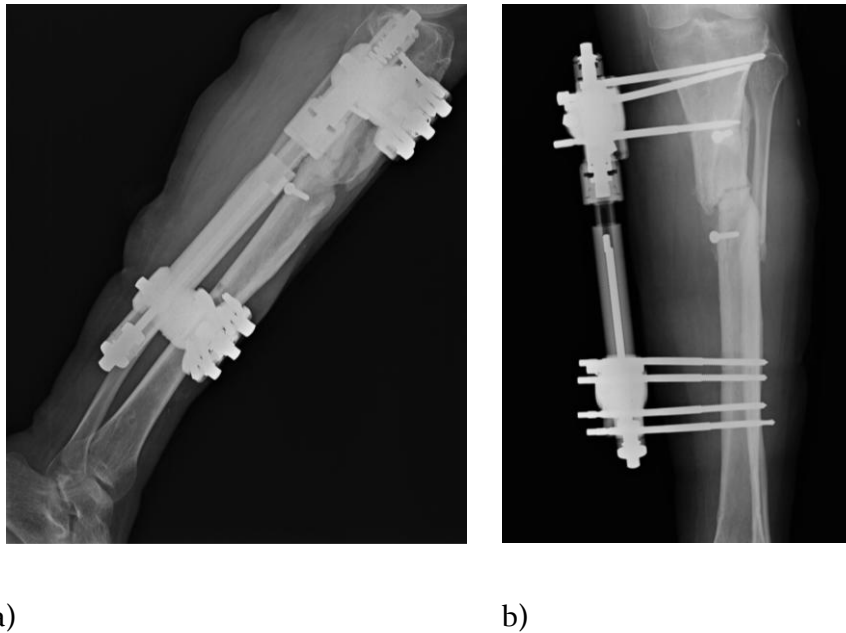


Figura 2. Infección de material de osteosíntesis en una fractura de tibia.

a) Radiografía lateral; b) radiografía anteroposterior del mismo paciente.

1.1.2.1. Presentación clínica, clasificación y etiología

Al igual que ocurre con el porcentaje de infección, la presentación clínica varía también en función del material de osteosíntesis empleado y su localización.

Habitualmente, se suele presentar de forma temprana como una infección aguda relacionada con la cirugía, principalmente cuando se asocia a fijadores externos. En el caso de las fijaciones intramedulares, el cuadro clínico suele aparecer varias semanas después de su implantación y suele manifestarse como un fallo en la consolidación de la fractura o en la regeneración de los tejidos blandos circundantes. Los síntomas que se presentan son inflamación de dichos tejidos, fiebre y escalofríos. La presencia de fístulas que comunican el implante con el exterior también es un indicativo de infección (8).

Las infecciones asociadas a los implantes en el tratamiento de fracturas pueden clasificarse según la ruta de infección en (10):

- Perioperatoria: la inoculación de los microorganismos ocurre durante la cirugía.
- Contigua: la contaminación de la herida se da durante el traumatismo (en fracturas abiertas) o a través de un foco de infección adyacente (piel, tejidos blandos).
- Hematógena: la dispersión de los microorganismos se da a través de la sangre o linfa desde un foco de infección alejado (piel, pulmones, vejiga, etc.). Este tipo de infección se da menos frecuentemente que en las infecciones asociadas a prótesis articulares (29).

Otro enfoque es aquel que clasifica estas infecciones según el tiempo en el comienzan los síntomas (10):

- Infección temprana (< 2 semanas): Adquirida predominantemente durante el traumatismo o la cirugía, y está causada por microorganismos virulentos. Se caracteriza por la aparición de dolor local, persistente, eritema, edema, hematoma y fiebre.
- Infección retardada (2-10 semanas) y tardía (10 semanas): Normalmente se clasifican de forma conjunta debido a la similitud entre la presentación clínica y tratamiento (30). Normalmente adquirida durante el traumatismo o la cirugía y causada por microorganismos poco virulentos. De manera ocasional puede

ocurrir por vía hematógena desde focos de infección alejados. Se caracteriza por dolor persistente o en aumento, pseudoartrosis y aflojamiento del implante, aunque también puede haber ausencia de síntomas.

Los microorganismos causantes de estas infecciones pueden ser similares a los casos de IPA y en general, a los casos de infección asociada a implantes, y es frecuente que se trate de microorganismos presentes de manera natural en la piel, como *Staphylococcus* sp., aunque también pueden darse casos de microorganismos ambientales, principalmente del suelo en el caso de fracturas abiertas (bacterias anaerobias, BGN no fermentadores, micobacterias atípicas). En los casos complicados y que requieran estancias más prolongadas en el hospital también pueden darse casos de infecciones nosocomiales causadas por SAMR, *P. aeruginosa* o *Acinetobacter* sp. Es de destacar que la frecuencia de infecciones polimicrobianas es mayor en estos casos que en las infecciones de prótesis articular (28).

1.2. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES ORTOPÉDICOS

El diagnóstico de las infecciones asociadas tanto a implantes protésicos como a material de osteosíntesis resulta complejo debido a la variabilidad en las manifestaciones clínicas, por lo que es necesario un abordaje interdisciplinar, tanto microbiológico, mediante el cultivo de líquido articular, de biopsias de tejido periprotésico o del propio implante, tinción de Gram, etc.; como no

microbiológico mediante exploración física, pruebas de imagen, determinación de parámetros bioquímicos y estudios de histopatología (7, 26, 31).

El diagnóstico microbiológico es el que dará la clave a la hora de instaurar el tratamiento adecuado para el microorganismo responsable, teniendo en cuenta además el tipo de infección del que se trate y su gravedad, ya que habitualmente la antibioterapia no es suficientemente efectiva y hay que recurrir al desbridamiento e incluso a la retirada del implante. En caso de ser necesaria la retirada de éste, es fundamental el procesamiento del mismo con el objetivo de aislar los microorganismos presentes, ya que tiene la ventaja de que se analiza directamente el lugar de la infección. El diagnóstico etiológico adecuado de la infección periprotésica sería, pues, lo ideal para establecer un tratamiento adecuado (31-33).

Actualmente aún no existe un criterio estandarizado para la definición de una infección protésica subaguda y la distinción entre ésta y un aflojamiento aséptico de prótesis en aquellos casos sin síntomas clínicos claros.

La utilización de ultrasonidos de baja intensidad para desprender los microorganismos de la biopelícula adherida al implante es una alternativa a los métodos de cultivo clásicos, habiéndose desarrollado varios protocolos con este propósito (34-38). Este método aumenta la sensibilidad en el diagnóstico, sin embargo está supeditada a la retirada del implante y no permite el diagnóstico prequirúrgico. En el caso de los implantes de osteosíntesis existe un problema adicional, que es el gran tamaño que pueden alcanzar algunos clavos

intramedulares, lo que supone una dificultad añadida a la hora de la sonicación (39). Esta dificultad se ha visto salvada por la utilización de bolsas de material plástico estéril, aunque ciertos estudios afirman que aumenta las probabilidades de contaminación, por ello la interpretación de los resultados debe ser cuidadosa (40). Además, a pesar del incremento en la sensibilidad, aún se dan casos de pacientes con infección clínica y cultivo negativo (41).

Para solventar el problema se han propuesto técnicas de biología molecular para obtener resultados más precisos y más rápidamente que con el cultivo convencional (34, 42-45), aunque aún no se ha establecido un método estándar que pueda aplicarse en todos los laboratorios.

Por todo ello, ante la sospecha de una infección lo ideal sería alcanzar un diagnóstico etiológico de modo que se permita establecer un tratamiento antibiótico lo más adecuado posible y determinar el tipo de abordaje quirúrgico, con el potencial empleo de implantes impregnados con antibióticos en caso de ser necesario.

1.3. PATOGENIA DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES ORTOPÉDICOS

La patogénesis de una infección de implante protésico es compleja, y no depende únicamente de las características del microorganismo. El desarrollo de la infección depende de múltiples factores y está determinada por la combinación de interacciones entre la superficie bacteriana, el implante y las condiciones y respuesta del paciente (15, 23, 24, 46).

La colocación de un implante, ya sea la cirugía de implantación de una prótesis articular, como la fijación de una fractura, produce una serie de cambios en los tejidos que da lugar a alteraciones en la respuesta inmune frente a una infección, viéndose además afectada la llegada de los antimicrobianos a la zona. Estas circunstancias son aprovechadas por los microorganismos que alcanzan la superficie del implante, dando lugar al desarrollo de la temida infección si se dan las condiciones. Además, las características del propio material (composición química, rugosidad, porosidad, carga) pueden actuar disminuyendo la inmunidad local o favoreciendo la adherencia bacteriana debido al aumento en la superficie disponible para la misma (23, 24, 47), influyendo de forma decisiva en el desarrollo de una infección.

La teoría de la “carrera por la superficie”, propuesta por A. Gristina (48) tiene una gran importancia en la explicación de la patogenia de estas infecciones. Esta teoría afirma que el éxito o el fracaso de un implante depende del balance entre la integración del mismo en el tejido del huésped y la posible colonización

bacteriana (49). Una vez que se coloca el implante éste se recubre de forma inmediata por proteínas del huésped como fibronectina, fibrinógeno, albúmina, vitronectina y colágeno y se depositan fibroblastos, etc. Si estas células establecen una unión estable sobre el material, la colonización por parte de las bacterias será más difícil, ya que se enfrentan a una capa de células viables e integradas con sus correspondientes mecanismos de defensa activos (22, 48, 50). En caso contrario, se desarrollará la infección, ya que las bacterias se unirán a la superficie del implante gracias a sus moléculas de adhesión en la superficie.

Estudios recientes demuestran que es necesaria una cobertura mínima de células del huésped sobre el implante para protegerlo de manera efectiva contra la contaminación bacteriana (51), pero se ha observado que también depende del número de bacterias presentes antes de la sedimentación de las células del huésped (49).

Una vez colonizada la superficie del implante, la principal característica que define a estas infecciones y que determina su desarrollo es el crecimiento de una biopelícula en la superficie del implante (24, 52, 53). Sin embargo, cuando un implante está infectado, las bacterias que causan la infección también pueden estar presentes en los tejidos y fluidos adyacentes, de ahí la importancia del estudio de dichos tejidos para diagnosticar la infección y, eventualmente, evitar una propagación de la infección al resto del organismo.

Las biopelículas también son las responsables de las complicaciones derivadas de este tipo de infecciones, como el fracaso de tratamiento antibiótico, las posibles recidivas tras la retirada del tratamiento y la aparición de infecciones tardías.

1.3.1. BIOPELÍCULAS

1.3.1.1. Definición

El concepto de biopelícula, definido por J. W. Costerton, es fundamental en la patogenia de la infección relacionada con biomateriales, pero también en otros tipos de infecciones e incluso en microbiología ambiental. Hasta las dos últimas décadas del siglo XX se pensaba que la forma más frecuente de crecimiento bacteriano era el crecimiento libre o planctónico, pero se ha observado que, en la naturaleza, la mayor parte de los microorganismos se agrupan para dar lugar a unas estructuras denominadas biopelículas, que se definen como comunidades complejas compuestas por células procariotas y/o eucariotas incluidas en una matriz polimérica compuesta, al menos parcialmente, por sustancias sintetizadas por las células sésiles de la comunidad (54). Esta matriz, compuesta por polisacáridos, proteínas, ADN extracelular, así como compuestos pertenecientes al propio huésped, protege a los microorganismos de agresiones externas, como el sistema inmune del huésped o los tratamientos antibióticos y proporciona estabilidad a la biopelícula (55, 56). Las primeras infecciones asociadas con biopelículas en implantes se descubrieron en los años 80 (55), pero la formación de biopelículas no ocurre únicamente en los implantes protésicos. Puede ocurrir en superficies como los dientes, en las válvulas cardíacas (endocarditis) o en los

pulmones de pacientes con fibrosis quística (20, 56-58), dando lugar a infecciones crónicas que producen daño tisular e inflamación persistente (59).

1.3.1.2. Características y propiedades

La formación de biopelículas es compleja y obedece a múltiples factores, aún no del todo conocidos (9, 60, 61), y pueden estar constituidas por un único tipo de organismo o por múltiples especies (62). La capacidad para formar una biopelícula no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy en día se considera que, bajo las condiciones adecuadas, todos son capaces de formar dichas estructuras (60).

La formación de una biopelícula sobre un implante sigue una secuencia característica (22, 24, 62, 63). En primer lugar los microorganismos se adhieren a la superficie mediante interacciones de tipo físico, y en este estadio inicial de adhesión, los microorganismos aún son susceptibles al tratamiento antibiótico. A continuación los microorganismos proliferan, formando microcolonias y segregando la matriz extracelular polimérica característica de estas formaciones, dando lugar a una unión irreversible en la que participan estructuras tales como cápsulas, fimbrias, pili, exopolímeros, etc., y en la que se dan interacciones de tipo químico, a nivel celular y molecular (23, 47). Posteriormente los microorganismos se estructuran en una formación tridimensional, en la cual se forman canales que permiten el transporte de distinto tipo de moléculas entre las bacterias, y se da un aumento en el espesor de la biopelícula. En los siguientes estadios puede haber liberación de microorganismos hacia otros focos donde

puede darse la formación de una nueva biopelícula. A partir de esta estructura madura, pueden liberarse bacterias que migrarán en forma planctónica y podrán dar lugar a una nueva biopelícula en otra región (52, 53, 56).



Figura 3. Proceso de formación de una biopelícula.

1. Unión al sustrato; 2. Crecimiento, proliferación y formación de microcolonias, con formación de la matriz extracelular; 3. Liberación de microorganismos hacia nuevos focos. P. Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University.

Tanto el crecimiento formando una biopelícula como la capacidad de comunicación mediante moléculas entre bacterias son dos aspectos comunes entre la mayoría de las especies bacterianas (9, 56, 64, 65). Las bacterias se comunican mediante la síntesis y reacción frente a moléculas. Este sistema de comunicación, denominado *quorum sensing* (QS), permite a las bacterias detectar la concentración de otras bacterias a su alrededor y responder mediante la activación de determinados genes que dan lugar a la producción de moléculas

tales como factores de virulencia, enzimas o toxinas, e influye en el desarrollo como tal de la biopelícula (9, 23, 56, 60, 62, 66). Estas moléculas del QS en la mayoría de bacterias Gram positivas son péptidos, mientras que en las Gram negativas predominan las N-acil-homoserin lactonas (AHL) (9, 56, 65, 67). Las bacterias requieren alcanzar una densidad mínima para activar este sistema y desencadenar la activación y desactivación de genes específicos, por lo que hasta ese momento no podría decirse que tengan su capacidad patógena completa. Del mismo modo que en el caso de las bacterias, se han encontrado moléculas de QS en diversas especies de hongos (56, 68).

Los microorganismos que forman parte de una biopelícula poseen una serie de características específicas que son diferentes a la de las bacterias en estado planctónico (69, 70), hecho que ha de tenerse en cuenta a la hora del diagnóstico y tratamiento de una infección. En este sentido, una de las características principales de estas comunidades, y que explica la persistencia de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas, es su mayor resistencia a los antimicrobianos (22, 24, 53, 54, 62, 71, 72), mostrando valores de CMI desde 100 hasta 1000 veces superior al de las bacterias en estado planctónico (69, 72, 73). Este hecho puede deberse a distintos mecanismos.

En primer lugar, la matriz extracelular fabricada por los microorganismos de la biopelícula puede evitar la permeabilidad de los antibióticos y retardar la difusión. Este hecho no afecta por igual a todos los antibióticos: disminuye mucho la difusión de aminoglucósidos y glucopéptidos, pero apenas modifica la

de rifampicina, macrólidos y clindamicina, y hoy en día se considera un mecanismo poco relevante (69).

Otro motivo que podría explicar esa mayor tolerancia es el hecho de que las bacterias que se encuentran formando parte de una biopelícula poseen distintos estados metabólicos en función de su localización (60, 63, 70). Las bacterias de la zona superior muestran un estado metabólico más activo, mientras que las que se sitúan en la zona más interna (población sésil), se encuentran en fase estacionaria, por lo que los antibióticos con actividad frente a bacterias en división no tendrían efecto sobre ellas. Además puede existir una activación de genes de resistencia que únicamente ocurre en estas formaciones (72).

Las bajas dosis de antibiótico que se consiguen con el tratamiento sistémico pueden aliviar los síntomas causados por las bacterias planctónicas que se liberan desde la biopelícula, pero las células sésiles de la comunidad no se ven afectadas y pueden seguir causando daño en los tejidos cuando el tratamiento se retire (73).

1.3.2. *STAPHYLOCOCCUS* SP. Y BIOPELÍCULAS

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, no móviles, no esporulados, catalasa-positivos, anaerobios facultativos que crecen por respiración aerobia o fermentación, con diámetro de 0,5-1 μm y con crecimiento en varios planos, dando lugar a un crecimiento en racimo (74).

Su pared está compuesta por peptidoglicano y ácidos teicoicos, de especial interés en los procesos de adhesión, además de presentar adhesinas y exotoxinas en su superficie.

Las especies con un mayor interés médico son *S. aureus* y *S. epidermidis*, ya que son responsables de un elevado número de infecciones. Entre éstas se encuentran las infecciones asociadas a implantes protésicos, siendo los microorganismos que con mayor frecuencia las producen (75). En ellas, el potencial patogénico está directamente relacionado con la capacidad de estos microorganismos para formar un biopelícula en la superficie del implante (22, 23, 63, 75, 76). Además, El CDC (*Centres for Disease Control and Prevention*) reconoce a los estafilococos como los microorganismos más frecuentemente aislados en el global de infecciones nosocomiales (63, 77).

Inicialmente la investigación en biopelículas se realizaba principalmente en *P. aeruginosa*, pero los recientes avances en el estudio molecular de estafilococos han dado lugar a que actualmente se encuentren entre los microorganismos más estudiados respecto a la formación de biopelículas.

S. aureus se considera un patógeno virulento que puede causar infecciones tanto en personas inmunodeprimidas como sanas. Esta bacteria se encuentra de forma normal en la piel y nasofaringe de algunos individuos, y se calcula que el 30% de la población es portadora (22, 77). Las infecciones causadas por *S. aureus* pueden ser de distinta gravedad, siendo especialmente preocupantes las causadas por SAMR. Estas cepas suelen encontrarse en los entornos hospitalarios,

caracterizándose por su resistencia a los antibióticos β -lactámicos (cloxacilina, penicilina, etc.), incluyendo cefalosporinas de tercera generación, y además a otros grupos de antibióticos, tales como aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos y lincosamidas (22). Además, la habitual exposición a vancomicina y otros glucopéptidos ha hecho que ciertas cepas de SAMR disminuyan su sensibilidad frente a estos, e incluso se han dado casos de *S. aureus* plenamente resistentes (78).

En ciertos casos, la persistencia de una infección asociada a implantes puede deberse a la presencia de las llamadas variantes de colonia pequeña o SCV. Estas son subpoblaciones de *S. aureus* que crecen lentamente en placas de agar como pequeñas colonias no pigmentadas y no hemolíticas, con una producción reducida de toxinas y metabolismo más lento, lo que las hace menos susceptibles a los antibióticos convencionales (79).

S. epidermidis forma parte de la microbiota de la piel, y se considera un patógeno oportunista, ya que principalmente causa infecciones en personas inmunocomprometidas (enfermos de SIDA, pacientes que reciben tratamientos inmunosupresores y pacientes con un cierto grado de inmunodepresión fisiológica, tales como neonatos (80)) o cuando existe una ruptura en la piel o las membranas mucosas y se facilita su entrada en el organismo (infecciones relacionadas con cirugías, catéteres, etc (22)).

Las infecciones asociadas a biomateriales causadas por *S. aureus* son similares a las producidas por *S. epidermidis*, aunque en general aquellas en las que está

implicado *S. aureus* suelen ser más sintomáticas debido a su mayor patogenicidad.

La formación de biopelículas en estafilococos sigue la misma secuencia que en otros microorganismos. La adherencia de *S. epidermidis* a la superficie del implante implica una unión rápida mediante factores no específicos (hidrofobicidad, fuerzas electrostáticas, tensión superficial) y específicos, mientras que la adherencia de *S. aureus* se ve más influida por la presencia de fibronectina, fibrinógeno y colágeno (15). Además, según Gristina et al. (48), la especie *S. epidermidis* tiene preferencia por adherirse a polímeros, mientras que *S. aureus* tiene tendencia hacia la unión a metales. Esto podría explicar el porqué *S. epidermidis* frecuentemente causa infecciones en implantes poliméricos, como los polietilenos, mientras que *S. aureus* causa un mayor número de infecciones en implantes metálicos, como el titanio. Esta observación se sigue considerando acertada en la actualidad (22, 24, 79).

Las bacterias de la especie *Staphylococcus* poseen una gran variedad de adhesinas y exotoxinas que participan como responsables de la adhesión a distintas superficies. Un ejemplo de ellas son las adhesinas de la familia de las MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), como por ejemplo la proteína de unión a colágeno o a fibronectina, que facilitan la adhesión a biomateriales y a proteínas de la matriz extracelular depositadas en la superficie del implante (81, 82). Sin embargo, el principal responsable de la adhesión intercelular en estafilococos es el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) o poli-N-acetilglucosamina (PNAG), un polímero

parcialmente deacetilado de β -1,6-N-acetilglucosamina presente tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* (55, 60, 76, 83-85). Este compuesto, junto con otras moléculas como proteínas y ácidos teicoicos forma el exopolímero o matriz extracelular en la que está embebida la biopelícula, protegiéndola de los antibióticos y fagocitosis. La producción del exopolisacárido está mediada por el operón *ica*, compuesto por el gen regulador *icaR* y los genes biosintéticos *icaADBC* (85-89). El gen *icaA* codifica para la N-acetilglucosamina transferasa; *icaD* proporciona una mayor virulencia a las cepas en las que se expresa junto con *icaA*; el gen *icaB* parece que codifica para una deacetilasa, e *icaC* para un exportador (90-92). Las bacterias no productoras del exopolímero son, por lo general, menos adherentes que las que si lo poseen y por ello menos patogénicas, mientras que las cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* productoras de glicopolisacárido son más virulentas, siendo las principales responsables de infecciones postquirúrgicas y de prótesis osteoarticulares.

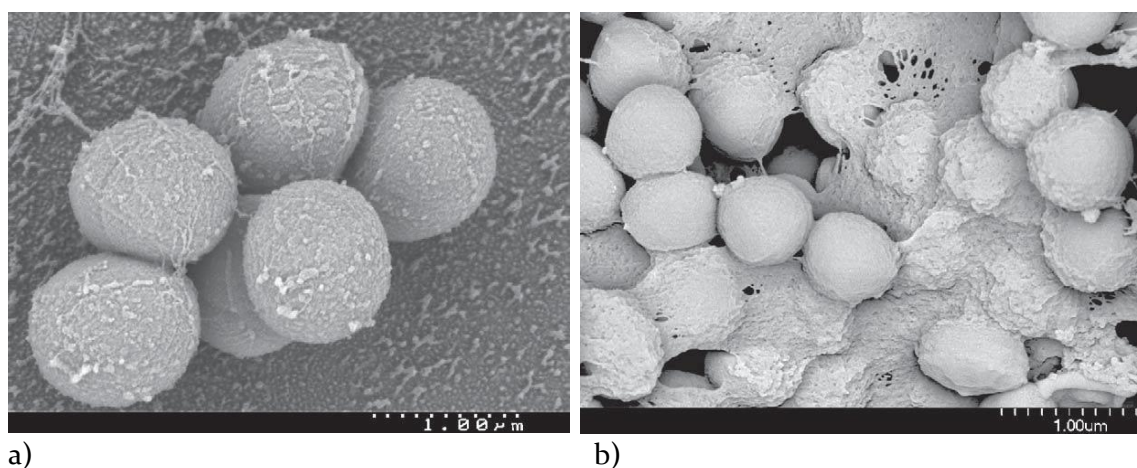


Figura 4. Imagen al microscopio electrónico de barrido de *S. aureus*.

a) Formación en racimo; b) biopelícula, en la que se pueden observar múltiples capas de bacterias embebidas en la matriz polimérica. Imagen tomada de Harris LG. 2006.

Junto con las moléculas de adhesión, la producción de toxinas extracelulares tales como α , β , γ y δ -hemolisina, PVL, proteasas, etc., por parte de los estafilococos contribuye a incrementar la dificultad en el tratamiento de estas infecciones. Tanto *S. aureus* como *S. epidermidis* son productoras de toxinas y proteasas, aunque las de este último son mucho menos tóxicas que las producidas por *S. aureus* (22, 79). Sin embargo, a pesar de ser menos virulento que este, se ha observado que, por lo general, es más resistente a los antibióticos que *S. aureus* (75).

La regulación de la formación de biopelícula en estafilococos es compleja, al igual que en otras especies. Existen varios sistemas de regulación en la literatura, como el *rfb* (93). Se han sugerido ciertas moléculas, como el péptido inhibidor de RNA III (*RIP*) (94, 95) que afectan a estos sistemas de regulación de la formación de biopelícula en estafilococos, por lo que podrían ser de utilidad para hacer frente las infecciones causadas por estos microorganismos.

1.4. TRATAMIENTO

En las infecciones asociadas a prótesis osteoarticulares el objetivo es erradicar la infección, dando lugar a un implante totalmente funcional que no cause molestias en el paciente (10, 96), mientras que en el caso del tratamiento de infecciones asociadas a material de osteosíntesis, el principal objetivo es la consolidación de la fractura y la prevención de una osteomielitis crónica (10, 28).

En general, el tratamiento a instaurar dependerá de cuatro factores fundamentales: el tipo y susceptibilidad del patógeno, la duración de los síntomas, la estabilidad del implante y las condiciones de los tejidos circundantes (15). Las decisiones a tomar son la necesidad de realizar una limpieza quirúrgica o de retirar el implante, y el tipo y duración del tratamiento antibiótico. La identificación de los microorganismos responsables es, por ello, indispensable para poder realizar una antibioterapia dirigida hacia el patógeno causante de la infección.

1.4.1. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES PROTÉSICAS

Existen varias aproximaciones en el tratamiento de las infecciones asociadas a implantes protésicos (15):

- Terapia antimicrobiana de larga duración: Consigue controlar las manifestaciones clínicas pero raramente erradica por completo la infección. En muchos pacientes los síntomas reaparecen tras la retirada del tratamiento. Este abordaje está indicado en pacientes con alto riesgo quirúrgico o en aquellos que rechacen la intervención (96).
- Desbridamiento con retención del implante: Indicado en pacientes con una infección temprana o con una infección hematógena aguda si los síntomas son inferiores a 3 semanas, el implante está estable, los tejidos circundantes en buen estado y es factible utilizar un agente antimicrobiano con buena actividad contra biopelículas. De vital

importancia es realizar un diagnóstico precoz. La realización del desbridamiento y el establecimiento del tratamiento antibiótico con rapidez permitirá actuar sobre los microorganismos causales antes de que hayan formado la biopelícula, con lo que las posibilidades de éxito son mayores. Todo ello dependerá de la estabilidad del implante y del agente patógeno. Las tasas de curación son muy variables, y los resultados son mejores en las infecciones por estreptococos o con desbridamiento muy precoz (primeros 5 días) (97). La infección por SAMR, BGN o la infección crónica, son factores indicadores de mal pronóstico con esta alternativa.

- Recambio en un tiempo: implica la retirada de la prótesis infectada y colocación de un nuevo implante en el mismo procedimiento quirúrgico. Este tratamiento permite una reimplantación más sencilla y una recuperación funcional más rápida. Está recomendado en pacientes sin comorbilidad severa, con los tejidos blandos en buen estado y cuando el microorganismo causante de la infección se conoce y no es de difícil erradicación (SAMR, hongos, etc.) (98, 99). Algunos estudios refieren tasas de curación del 86-100%, pero su eficacia es tema de controversia. Su empleo incluye la fijación con cemento impregnado con antibiótico (generalmente aminoglucósidos), acompañado de un tratamiento antibiótico sistémico (100). Un inconveniente de este tratamiento es la imposibilidad de utilizar un antibiótico específico en el cemento por el desconocimiento del agente etiológico.

- Recambio en dos tiempos: Implica la retirada del implante infectado y la colocación del nuevo material en procedimientos quirúrgicos distintos. Es el tratamiento más efectivo, con tasas de curación entre el 80-92% (101) y el procedimiento de elección en infecciones crónicas con tejidos blandos dañados, presencia de pus, fístulas o microorganismos de difícil erradicación (96). El intervalo entre cirugías puede ir desde 2 semanas hasta 6 meses. Durante ese tiempo al paciente se le coloca un espaciador o una fijación externa para asegurar la longitud del miembro y proporcionar cierta movilidad, además de aplicarse un tratamiento sistémico con antibióticos entre cirugías. El espaciador frecuentemente se trata de un cemento cargado con antimicrobianos (10). La alteración que el cemento ejerce sobre los mecanismos defensivos en el espacio periprotésico, ha llevado a utilizar prótesis porosas fijadas sin cemento, pero los aflojamientos asépticos parecen ser más frecuentes y la recuperación funcional peor. El mismo problema ha motivado el empleo de injertos óseos, sin que por el momento haya una gran experiencia.
- Retirada permanente del implante o artrodesis: Se realiza normalmente en pacientes altamente inmunocomprometidos, con elevado riesgo de reinfección y en aquellos en los que la artroplastia no reporta ningún beneficio funcional (15).

1.4.2. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS

En las infecciones asociadas a material de osteosíntesis en el tratamiento de fracturas, de igual modo que en las protésicas, el tratamiento se basa en cirugía y terapia antimicrobiana, aunque el abordaje será algo diferente en función del tipo de implante, la gravedad de la infección, el microorganismo patógeno y el estado del paciente (3).

En los casos en que el material se encuentre estable, el desbridamiento con retención del implante en combinación con un tratamiento antibiótico prolongado es lo más razonable (102, 103).

El recambio en un tiempo incluye la retirada y colocación de un nuevo implante en el mismo procedimiento quirúrgico. Si la infección está causada por un microorganismo difícil de tratar como SAMR es preferible la retirada completa del implante.

En los casos de osteomielitis crónica asociada a un implante de fijación, la terapia quirúrgica debe incluir una reconstrucción tanto ortopédica como plástica, ya que las posibilidades de curación de una infección ósea a largo plazo son escasas, y a menudo complicadas por la aparición de fistulas y sequestros óseos. Cuanto mayor es la duración y la extensión de la infección, más agresiva debe ser la intervención quirúrgica y más prolongado el tratamiento antibiótico (17, 28).

1.4.3. ANTIBIOTERAPIA

Los agentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento empírico de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, tanto prótesis como material de osteosíntesis, deben ser activos contra los principales patógenos implicados en estas infecciones, principalmente estafilococos (15). Además deben alcanzar concentraciones elevadas, tener una actividad demostrada contra biopelículas y ser poco tóxicos en tratamientos prolongados. Una vez identificado el microorganismo causante de la infección, el tratamiento debe ir dirigido hacia el agente patógeno en cuestión.

El tratamiento con rifampicina parece ser el más indicado, ya que es uno de los antibióticos con mejor actividad frente a biopelículas como afirman varios estudios (104, 105), además presenta una actividad intracelular excelente (106), pero siempre debe ser administrado en combinación con otro antibiótico para prevenir la aparición de resistencias (10, 102, 103, 107-109).

Los antibióticos más frecuentemente utilizados en combinación con rifampicina son las quinolonas, como por ejemplo ciprofloxacino, debido a su biodisponibilidad y buena actividad. Su actividad frente a estafilococos en infecciones asociadas a implantes ha sido ampliamente demostrada (96, 110-112), aunque los casos de SAMR no suelen poder tratarse con estos antibióticos por la posible aparición de resistencia (15). La mayoría de *S. aureus* sensibles a meticilina lo son también a quinolonas, pero un 50% de los SCN y la mayoría de los SARM en España son resistentes, lo cual debe tenerse en cuenta en los

tratamientos empíricos. Las combinaciones de rifampicina con clindamicina o cotrimoxazol son otras alternativas de gran eficacia (10, 107, 113).

Los antibióticos β -lactámicos (cloxacilina y cefalosporinas) han sido las drogas clásicas de elección frente a los cocos Gram positivos, pero requieren habitualmente una vía parenteral y pierden gran parte de su actividad bactericida en el seno de la biopelícula. A pesar de ello, se recomiendan en el tratamiento parenteral inicial (durante 2-4 semanas) para reducir la carga microbiana y pasar posteriormente a la terapia por vía oral. Una alternativa a los β -lactámicos son los glucopéptidos, especialmente vancomicina, si bien posee una actividad contra microorganismos Gram positivos algo menor que los β -lactámicos. Por este motivo se recomienda su utilización cuando éstos u otros antimicrobianos están contraindicados debido a resistencias o hipersensibilidad. La aparición de casos de resistencia a vancomicina ha ido en aumento en los últimos años, por lo que la utilización de otras alternativas está siendo cada vez más frecuente (111).

Linezolid, una oxazolidonona con buena actividad frente a cocos Gram positivos se ha posicionado como una buena opción en el tratamiento de las infecciones asociadas a implantes ortopédicos causadas por estafilococos en los últimos años, ya que es activo frente a SAMR y algunos microorganismos resistentes a vancomicina (114, 115). La combinación junto con rifampicina ha dado lugar a buenos resultados (106). Además, posee una biodisponibilidad oral del 100% y una elevada penetración tisular, aunque se trata de un fármaco en general bacteriostático, y un tratamiento prolongado puede dar lugar a efectos secundarios de gravedad (15).

Daptomicina, un lipopéptido cíclico también posee buena actividad frente a bacterias Gram positivas, incluyendo también SAMR y *S. aureus* resistentes a vancomicina (116, 117), si bien su principal inconveniente es la necesidad de administración parenteral.

Otra posibilidad es el uso de tigeciclina, una glicilglicina con amplio espectro, activo frente a microorganismos aerobios Gram positivos y Gram negativos, anaerobios y patógenos atípicos, incluyendo SAMR, estreptococos resistentes a penicilina y quinolonas, enterococos resistentes a vancomicina y enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (118), aunque no se ha evaluado en infecciones protésicas.

En las infecciones por enterobacterias y *P. aeruginosa*, las quinolonas han demostrado equivalencia con cefalosporinas o β -lactámicos junto con aminoglucósidos (119). Hoy en día, se consideran los antibióticos de elección en la infección protésica por BGN sensibles, por su mayor actividad bactericida en la biopelícula y su administración oral, siendo ciprofloxacino el más utilizado

En casos de alto riesgo quirúrgico se han ensayado tratamientos supresores indefinidos con agentes tales como las tetraciclinas (como la doxiciclina) o el cotrimoxazol con porcentajes de buena respuesta superiores al 70%.

La duración del tratamiento antibiótico varía en función del paciente, del tipo de implante, el microorganismo patógeno, y del abordaje empleado. La duración del tratamiento antibiótico no está bien definida, variando entre 1 y 6 meses según

distintos autores. Actualmente se defiende la idea de adecuar el tratamiento a la respuesta clínica de cada paciente de forma individualizada.

En general, en pacientes con retención del implante, recambio en un tiempo o en dos tiempos con un intervalo corto el tratamiento recomendado es de 3 meses. En el caso de las artroplastias de rodilla, el tiempo recomendado es mayor, de 6 meses. El tratamiento intravenoso es recomendable durante 2-4 semanas, seguido por terapia oral hasta completar el tratamiento (10, 11).

En pacientes con recambio en dos tiempos con un intervalo largo entre cirugías y sin espaciador, el objetivo del tratamiento antibiótico es la completa eliminación de la infección en ausencia de ningún material. El tratamiento intravenoso se administra durante 6 semanas tras la retirada del implante, si bien pueden usarse fármacos administrables por vía oral si la biodisponibilidad es buena y el microorganismo es sensible. Dos semanas antes de la reimplantación se retira el tratamiento antibacteriano con el objetivo de obtener muestras para el cultivo e histopatología en la segunda cirugía cuyos resultados sean fiables. Si los resultados son negativos y no hay inflamación aguda, el tratamiento se detiene. En caso contrario, este se continúa durante 3 ó 6 meses en función del implante.

En el caso de las fijaciones de fracturas, el tratamiento es de 3 meses cuando hay mantenimiento del implante y de 6 semanas cuando hay una retirada total del implante (103). En aquellos casos sin disponibilidad de un antibiótico eficaz frente a bacterias adherentes, se mantiene el implante hasta que la fractura consolide y se pueda realizar la cirugía. Posteriormente el tratamiento se

prolonga durante al menos 2 semanas después de la retirada de todo el material para evitar el desarrollo de una osteomielitis crónica (111).

Actualmente, la antibioterapia en el tratamiento de las infecciones asociadas a implantes ortopédicos plantea una serie de dudas referidas a la duración del tratamiento y la vía de administración, ya que en los últimos años se están desarrollando numerosas alternativas. Los tratamientos convencionales utilizados de rutina han demostrado en ocasiones una falta de eficacia, por lo que la liberación local de antibióticos en el tejido infectado podría disminuir este problema, alcanzándose altas concentraciones de antibiótico en el foco de infección con mucha menor toxicidad sistémica.

El desarrollo de nuevos biomateriales, la modificación en las propiedades de los ya existentes y el desarrollo de nuevos recubrimientos son estrategias que se están desarrollando con el objetivo de disminuir la formación de biopelículas sobre el implante y por lo tanto la incidencia de las infecciones asociadas a ellos, facilitando el tratamiento.

2. OBJETIVOS

Objetivos

1. Evaluar la eficacia del kit comercial GenoType BC (Hain Lifescience, Alemania) basado en un protocolo de PCR de amplio rango e hibridación como método de detección e identificación de microorganismos en muestras de pacientes con sospecha de infección asociada a implantes protésicos.
2. Analizar la capacidad formadora de biopelícula *in vitro* en cepas clínicas de *Staphylococcus sp.* aisladas de casos de infección asociada a prótesis y material de osteosíntesis, mediante técnicas fenotípicas y genotípicas, directas e indirectas.
3. Estudiar la sensibilidad de las cepas anteriores a antimicrobianos comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones osteoarticulares, tanto en estado planctónico como formando biopelícula.
4. Analizar el efecto de la combinación de NAC y eritromicina a concentración subinhibitoria con los mismos antibióticos del estudio de sensibilidad sobre las mismas cepas.
5. Estudiar la capacidad del péptido *RIP* para inhibir la formación de biopelícula en cepas de *Staphylococcus sp.*

6. Evaluar la utilidad del biomaterial de sílice mesoporoso SBA-15 como vehículo de liberación de rifampicina, vancomicina y linezolid, tanto de manera individual como en combinación.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

El aislamiento de los microorganismos empleados en los distintos experimentos se realizó a partir de prótesis osteoarticulares (rodilla, cadera) y material de osteosíntesis (clavos, tornillos, placas metálicas). Estas muestras fueron obtenidas a partir de pacientes con diagnóstico de infección asociada a material protésico en la Fundación Jiménez Díaz y en el Hospital Universitario de La Princesa (Madrid) durante el periodo comprendido entre 2004 y 2009.

Dichas muestras se trasladaron al laboratorio de Microbiología Clínica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid en condiciones asépticas y una vez allí, se procesaron de acuerdo a un protocolo de sonicación previamente desarrollado en el laboratorio (36). Las muestras se introdujeron en bolsas plásticas estériles con 50 mL de PBS estéril (bioMérieux, Francia) y se cerraron herméticamente. Una vez con la muestra en su interior, se sumergieron en un baño de ultrasonidos (*Ultrasons-H 3000840*; J. P. Selecta, España) a baja potencia durante 5 minutos. El fluido sonicado se retiró de las bolsas asépticamente y se centrifugó a 3000 g durante 20 minutos, tras los cuales se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 5 mL del mismo tampón estéril.

Tras el procesamiento, se sembraron 10 µL del fluido sonicado para cada muestra en los siguientes medios de cultivo: agar Shaedler + 5% sangre de cordero (SCS), agar Triptosa-Soja + 5% sangre de cordero (TSS), agar chocolate + PolyViteX™ (PVX), agar MacConkey (MCK), agar Sabouraud-Cloranfenicol (bioMérieux,

Francia) y agar Middlebrook 7H10 (BD, Estados Unidos). Además, se realizó una tinción de Gram con 10 µL del sonicado. Por cada muestra se conservaron 2 mL del líquido sonificado a -20°C para futuros estudios. Los distintos medios se incubaron según las condiciones adecuadas en cada caso:

TSS y PVX: 37°C y 5% CO₂; 7 días

Middlebrook 7H10: 37°C y 5% CO₂; 15 días

MCK: 37°C en atmósfera normal, 1 día

SCS: 37°C en atmósfera anaerobia, 7 días

Agar Sabouraud-Cloranfenicol: temperatura ambiente y atmósfera normal, 30 días.

Todos los medios se revisaron diariamente para comprobar la presencia de crecimiento microbiano. Los microorganismos aislados se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales y galerías comerciales (bioMérieux, Francia). (120).

Hasta el momento de su estudio las cepas permanecieron congeladas a -20°C en viales de leche desnatada estéril (Oxoid, Reino Unido). Antes del inicio de cada experimento en cuestión se procedió a la descongelación, siembra e incubación en placas TSS (bioMérieux, Francia), comprobando la pureza del aislamiento en cada caso.

3.2. EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COMERCIAL DE PCR-HIBRIDACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN

De manera independiente al procedimiento citado en el apartado anterior y con posterioridad, se realizó la evaluación del sistema comercial GenoType BC[®] (Hain Lifescience, Alemania) como método de detección de microorganismos presentes en infecciones asociadas a material protésico a partir del sonicado del implante.

Este kit se utilizó tanto en su versión GenoType BC Grampositive[®] como GenoType BC Gramnegative[®] con el objetivo de cubrir el mayor rango posible de microorganismos a identificar.

A partir de las alícuotas congeladas de fluido sonicado se realizó la extracción de ADN mediante dos mecanismos dependiendo de la presencia o no de sangre en ellas. Para aquellas muestras sin presencia aparente de sangre la extracción se llevó a cabo mediante un método comercial basado en extracción inmunomagnética (EasyMag; bio-Mérieux, Francia). Por otra parte, las muestras con presencia de sangre se procesaron con el kit comercial MoLYsis Complete 5 (Molzym GmbH & Co. KG, Alemania). Los extractos de ADN se conservaron a -20°C en un volumen final de 50 µL. Para ello se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante con ligeras modificaciones.

Las muestras de ADN ya extraídas de los sonicados y conservadas a -20°C se amplificaron mediante PCR siguiendo el siguiente esquema:

Tabla 1. Condiciones de la amplificación por PCR.

INICIO	DESNATURALIZACIÓN	ALINEAMIENTO	ELONGACIÓN	Nº CICLOS	ELONGACIÓN FINAL
95°C 8 min	95°C 30 s	55°C 40 s	72°C 40 s	32	72°C 8 min

Tras la amplificación se prepararon los reactivos proporcionados en el kit, añadiendo 20 µL de cada producto de PCR. A continuación se colocaron las tiras de nitrocelulosa en la bandeja del hibridador, de manera que quedasen cubiertas por la solución ya preparada de reactivos más el ADN amplificado. Tras el procedimiento de hibridación realizado según el protocolo proporcionado por el fabricante, las tiras se retiraron con unas pinzas estériles y se secaron con papel absorbente. Posteriormente se procedió a la lectura e interpretación de los resultados

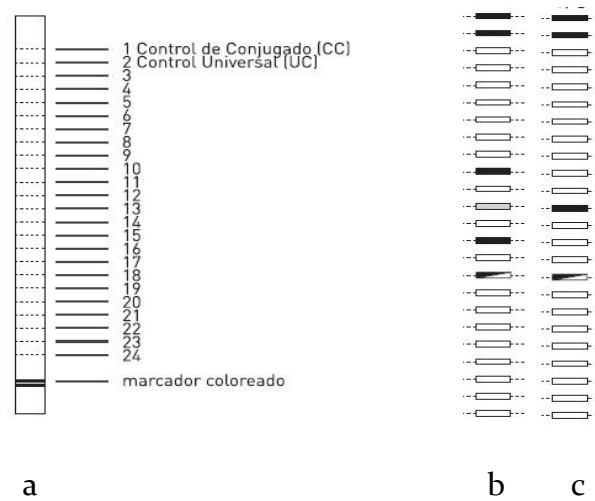


Figura 5. . Muestras de una tira de nitrocelulosa.

a) Muestra de una tira conteniendo las distintas sondas para la hibridación. b) Resultado esperable para la especie *S. aureus*. c) Resultado esperable para la especie *S. epidermidis*.

3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULA

3.3.1. CEPAS

Tras realizar el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las muestras protésicas siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 1, se seleccionaron las primeras 32 cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, concretamente 17 *Staphylococcus aureus* y 15 *Staphylococcus epidermidis*. Además se incluyeron las cepas *S. aureus* 15981 y *S. epidermidis* ATCC 35984, ambas formadoras de biopelícula. La procedencia de dichas cepas clínicas se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Origen de las cepas clínicas de estudio.

CEPA	ESPECIE	ORIGEN
P-1	<i>S. aureus</i>	Osteosíntesis
P-2	<i>S. aureus</i>	Cadera
P-4	<i>S. aureus</i>	Cadera
P-18	<i>S. aureus</i>	Cadera
P-19	<i>S. aureus</i>	Cadera
P-41	<i>S. aureus</i>	Osteosíntesis
P-61T3	<i>S. aureus</i>	Clavo
P-61T4	<i>S. aureus</i>	Clavo
P-62A	<i>S. aureus</i>	Osteosíntesis
P-68	<i>S. aureus</i>	Osteosíntesis
P-82.1	<i>S. aureus</i>	Osteosíntesis
P-95	<i>S. aureus</i>	Clavo
P-104.1	<i>S. aureus</i>	Osteosíntesis
P-112	<i>S. aureus</i>	Osteosíntesis
P-138	<i>S. aureus</i>	Cadera
P-251	<i>S. aureus</i>	Clavo
P-272.1	<i>S. aureus</i>	Rodilla
P-6.5	<i>S. epidermidis</i>	Clavo
P-23.2	<i>S. epidermidis</i>	Cadera
P-33.1	<i>S. epidermidis</i>	Cadera
P-53B	<i>S. epidermidis</i>	Cadera
P-55	<i>S. epidermidis</i>	Cadera
P-61T1	<i>S. epidermidis</i>	Clavo
P-61T2	<i>S. epidermidis</i>	Clavo
P-74	<i>S. epidermidis</i>	Cadera
P-101	<i>S. epidermidis</i>	Cadera
P-146G	<i>S. epidermidis</i>	Clavo
P-146B	<i>S. epidermidis</i>	Clavo
P-194	<i>S. epidermidis</i>	Osteosíntesis
P-223	<i>S. epidermidis</i>	Cadera
P-236	<i>S. epidermidis</i>	Rodilla
P-281	<i>S. epidermidis</i>	Rodilla

Para la evaluación de la capacidad formadora de biopelícula por parte de estas cepas se utilizaron diversos tipos de técnicas, tanto genotípicas, con las que buscamos la presencia de determinados genes implicados en la formación de dichas estructuras, como fenotípicas, directas e indirectas.

3.3.2. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LOS GENES *ica A*, *ica D* e *ica R* POR PCR

Para la detección de los genes *ica A*, *ica D* e *ica R* se realizó la extracción del ADN bacteriano mediante el protocolo descrito por Ausubel et al. (121) con modificaciones.

El día anterior a la extracción se descongelaron las bacterias en placas TSS y se incubaron a 36°C y 5% CO₂. Para proceder a la extracción se llevó a cabo la recogida de un asa de cultivo bacteriano a partir de la placa de TSS y se resuspendió en 100µL de proteinasa K 20 mg/mL (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en tubos de 1 mL estériles para cada cepa. A continuación, se añadieron 100µL de lisozima 30 mg/mL (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se completó hasta 600 µL con tampón TE 50mM pH 8. Después se mezcló con vórtex y se incubó durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente, se añadieron a cada tubo 100µL de NaCl 5 mM y 60 µL de CTAB/ NaCl mezclándolo con la pipeta. Se incubó a 65°C durante 10 minutos y a continuación se procedió a añadir un volumen de cloroformo/ alcohol isoamílico 24:1. Tras mezclar y centrifugar durante 5 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio estéril de 1mL y se añadió un volumen de fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico 25:24:1. Después de

centrifugar de nuevo y pasar la fase acuosa a otro tubo limpio estéril, se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol y se mezcló hasta que empezó a precipitar el ADN. De nuevo se centrifugaron los tubos durante 5 minutos y se eliminó el alcohol isoamílico con ayuda de la micropipeta. Posteriormente en los mismos tubos se añadió 1 mL de etanol 70% a 4°C, se centrifugaron durante 2 minutos y se eliminó el etanol, dejando secar los tubos en los cuales quedó el ADN precipitado en el fondo. Por último se resuspendió el pellet añadiendo a cada tubo 100 µL de tampón TE 50mM pH 8. Estos tubos se conservaron congelados a -20°C.

Una vez extraído el ADN se preparó la amplificación del ADN por PCR, para lo cual se utilizaron los tubos comerciales PureTaq® Ready-To-Go® PCR beads (GE Healthcare, Reino Unido). Estos tubos contienen todos los elementos necesarios para llevar a cabo la PCR (Taq polimerasa, dNTPs, etc.), y sólo hubo que añadir el ADN, los cebadores y MgCl₂ 25 mM. La mezcla de reacción se realizó siguiendo el siguiente esquema: 0,2µL de cada cebador; 1,5 µL de MgCl₂; y hasta 23µL de agua destilada por cada muestra. Los cebadores utilizados para la detección de los genes *ica A*, *ica D* e *ica R* fueron los siguientes (Grupo Taper, España) (86, 87):

5' TCTCTTGCAGGAGCAATCAA ₃ ' (forward)	}	<i>ica A</i>
5' TCAGGCACTAACATCCAGCA ₃ ' (reverse)		

5' ATGGTCAAGCCCAGACAGAG ₃ ' (forward)	}	<i>ica D</i>
5' CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA ₃ ' (reverse)		

5' TACTGTCCTCAATAATCCCGAA ₃ ' (forward)	}	<i>ica R</i>
3' GGTACGATGGTACTACACTTGATG ₅ ' (reverse)		

A cada tubo comercial (uno por muestra) se le añadieron 23 µL de la mezcla de reacción y 2 µL del ADN correspondiente.

Después se procedió a realizar la amplificación del ADN en un termociclador (*PT-100 MJ Research*, Estados Unidos). Las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Condiciones de la amplificación por PCR

Condiciones	INICIO	DESNATURALIZACIÓN	ALINEAMIENTO	ELONGACIÓN	Nº CICLOS	ELONGACIÓN FINAL
Genes						
<i>ica A/ D</i>	94°C 5 min	94°C 30 s	60°C 1 min	72°C 30 s	50	72°C 10 min
<i>ica R</i>	96°C 5 min	95°C 1 min	55°C 30 s	72°C 30 s	40	72°C 5 min

Tras obtener el ADN amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa, España) al 2%, obteniéndose las bandas correspondientes a los genes *ica A* (188 pb), *ica D* (198 pb) e *ica R* (453 pb) en las cepas en las que estos genes estaban presentes. Se utilizó como control de peso molecular un marcador de 5 bandas (*DNA ladder*, BioRad, Estados Unidos).

3.3.3. TEST EN PLACAS MULTIPOCILLO (MtP)

Esta prueba se realizó siguiendo la técnica de Christensen (122, 123) con mínimas modificaciones.

Por cada cepa se preparó una suspensión 0,5 McFarland en 2 mL de caldo MH-II a partir de placas TSS incubadas durante 18 horas a 36°C y 5% de CO₂. Para comprobar el inóculo se realizaron diluciones seriadas y recuento de colonias en placas TSS.

De cada suspensión se inocularon 100 µL/pocillo en una placa P-96 (Corning, Estados Unidos) por triplicado. También se incluyó un control negativo con medio MH-II sin bacterias. Esta placa se incubó a 37°C durante 24 horas sin

agitación. Pasado este tiempo se renovó el medio de manera estéril y se prolongó la incubación durante otras 24 horas. Posteriormente, tras retirar el medio se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y se dejó secar la placa al aire. Una vez seca, se añadieron 150 μ L de colorante Cristal Violeta (Panreac, España) a cada pocillo, incubándose durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se retiró el colorante y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. De nuevo se dejó secar y se llevó a cabo la decoloración con 200 μ L de etanol 95% durante 3 minutos. Por último, se traspasaron 100 μ L de cada pocillo a una nueva placa estéril para proceder a la medición de la densidad óptica (D.O.) a 540 nm en un lector Opsys MR (Dynex technologies, Estados Unidos).

3.3.4. TEST DE STEPANOVIC

Como complemento a la técnica anterior se realizó el test de Stepanovic (124). Se trata de un método muy similar a la técnica MtP, pero que permite deducir el grado de adherencia de cada cepa de forma indirecta.

En primer lugar y como en el caso anterior, se realizó la inoculación de los pocillos y la renovación del medio a las 24 horas. Tras la segunda incubación de 24 horas y tres lavados se realizó la fijación de las bacterias con 200 μ L de metanol 99% durante 15 minutos. Transcurridos esos minutos la placa se dejó secar y se procedió a teñir con 200 μ L de colorante Cristal Violeta durante 5 minutos. A continuación se lavaron los pocillos con agua corriente y se dejó secar la placa. El último paso consistió en resolubilizar el colorante con 160 μ L de ácido acético glacial al 33 % (v/v) y medir la D.O. a 570 nm.

El grado de adherencia de cada cepa se determinó de forma indirecta según la escala creada por el autor de la técnica y que se muestra a continuación:

D.O._c: D.O. del control negativo

D.O. < D.O._c: No adherente

D.O._c < D.O. ≤ 2x D.O._c: Adherencia débil

2x D.O._c < D.O. ≤ 4x D.O._c: Adherencia moderada

4x D.O._c < D.O.: Adherencia fuerte

3.3.5. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL (CLSM)

Al igual que en las dos técnicas anteriores, se prepararon las correspondientes suspensiones 0,5 McFarland para cada cepa en 2 mL de medio MH-II y se realizaron los recuentos para la comprobación del inóculo. En este caso, las placas de cultivo utilizadas fueron P-24 (Nunc, Dinamarca), y en el fondo de cada pocillo se colocó un disco estéril de poliestireno Thermanox[®] de 13 mm de diámetro (Nunc, Dinamarca). Una vez colocados los discos, se inoculó 1 mL de la solución 0,5 McFarland correspondiente en cada pocillo y se incubó la placa 24 horas a 37 °C sin agitación. Pasado este tiempo se renovó el medio y se incubó durante otras 24 horas, tras las cuales se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Cada disco se pasó a un portaobjetos, con la superficie que contenía las bacterias hacia arriba y se añadieron 25 µL de la tinción fluorescente Life/Dead[®] BacLight[™] (Invitrogen, Estados Unidos). Los discos con la tinción se incubaron

durante 15 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente y en cámara húmeda, y posteriormente se lavaron con agua destilada. A continuación se procedió a su observación en el microscopio láser confocal (Leica, Suiza) con objetivo de 40X.

3.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de esta parte del estudio se utilizaron las pruebas de Chi-cuadrado, test exacto de Fisher y prueba de Mann-Whitney para realizar las distintas comparaciones entre especies, cepas y experimentos. Estos cálculos se realizaron con los programas informáticos SPSS 13.0 (IBM, Estados Unidos), y STATA (StataCorp., Estados Unidos).

3.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD *IN VITRO*

3.4.1. CEPAS

Los estudios de sensibilidad se realizaron con las mismas cepas del apartado 3.1, tanto con las bacterias en estado planctónico como formando biopelícula. Igualmente se incluyeron las cepas control formadoras de biopelícula *S. aureus* 15981 y *S. epidermidis* ATCC 35984.

3.4.2. ANTIMICROBIANOS

Los antibióticos utilizados para los estudios de sensibilidad fueron los siguientes: rifampicina, vancomicina, ciprofloxacino, cotrimoxazol, cloxacilina, clindamicina, (Sigma, Alemania), tigeciclina, linezolid (Pfizer, Estados Unidos), daptomicina

(Novartis, Estados Unidos) y fosfomicina (ERN, España). Todos ellos se prepararon conforme a las normas del CLSI (125), utilizándose la determinación de la CMI de la cepa *S. aureus* ATCC 29213 como control, tras lo cual se mantuvieron conservados a -80°C en alícuotas.

De manera adicional, en el estudio con biopelículas también se determinó el efecto de la combinación de los citados antibióticos con N-Acetilcisteína (NAC) (Sigma, Alemania) y eritromicina (Sigma, Alemania) a concentración subinhibitoria. Para ambos compuestos se determinó previamente la CMI con el objetivo de determinar las concentraciones con las que posteriormente se iban a realizar los ensayos con las biopelículas.

3.4.3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BACTERIAS PLANCTÓNICAS

Los estudios de sensibilidad en bacterias planctónicas se realizaron mediante el método de microdilución en placa siguiendo las recomendaciones del CLSI (125) por triplicado.

Para cada cepa se preparó una suspensión 0,5 McFarland en caldo MH-II a partir de placas TSS incubadas durante 18 horas a 36°C y 5% de CO₂ y se preparó una dilución 1:10 para la posterior inoculación de las placas. La comprobación del inóculo se realizó mediante diluciones seriadas y posterior siembra y recuento de colonias en placas TSS.

Los rangos de concentración empleados para los ensayos de sensibilidad fueron los siguientes:

- Fosfomicina de 0,06-128 mg/L
- Vancomicina, cotrimoxazol, cloxacilina, daptomicina y linezolid de 0,015-32 mg/L
- Tigeciclina, clindamicina y ciprofloxacino de 0,004-8 mg/L
- Rifampicina de 0,001-4 mg/L

Para cada antibiótico y cepa, se repartieron 100 µL de las diluciones de antibiótico correspondientes + 5 µL del inóculo/ pocillo. Asimismo, en todas las placas se incluyó un control negativo de medio MH-II estéril sin bacteria.

En el caso de los ensayos con daptomicina se le añadió al caldo MH-II un suplemento de CaCl_2 a 50 mg/L de concentración final, mientras que en el caso de la fosfomicina se añadió un suplemento de glucosa-6-fosfato (25 mg/L).

Para la determinación de la CMI, las placas se incubaron durante 24 horas y se procedió a la lectura de los resultados. Tras obtener los datos se calcularon la CMI_{50} , CMI_{90} y los porcentajes de resistencia según los puntos de corte establecidos por el EUCAST y CLSI (125, 126). La determinación de la CMB se realizó mediante recuento de colonias en placas TSS tras sembrar el contenido de los pocillos sin crecimiento visible. La CMB se estableció como la concentración mínima capaz de destruir el 99,9% del crecimiento de la muestra. Tras realizar

los ensayos con los anteriores antibióticos se realizó la determinación de la CMI para NAC con el fin de establecer una concentración con la que trabajar en el estudio posterior y de eritromicina para establecer la concentración subinhibitoria. En el caso de la NAC, el rango testado fue de 16384 a 8 mg/L, mientras que para la eritromicina fue de 0,004-8 mg/L. En ambos casos se siguió el mismo protocolo que para el resto de antibióticos.

3.4.4. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BIOPELÍCULAS

3.4.4.1. Estudios con un solo compuesto

Para la determinación de la CMEB se utilizó el método de Calgary (CBD), utilizando las placas *MBEC® device* (Innovotech, Canadá) (127), que consisten en una placa P-96 con la peculiaridad de contener en la tapa unos salientes sobre los cuales se va a formar la biopelícula tras sumergirlos en el inóculo bacteriano.



Figura 6. Detalle de una placa “MBEC® device”.

Al igual que para la determinación de la CMI, se preparó el inóculo correspondiente a cada cepa y se repartieron 150 µL/pocillo en una placa *MBEC*® *device*. Esta placa se incubó a 36°C en agitación a 120 rpm durante 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, se realizó un lavado de la tapa en PBS estéril y antes de exponer las biopelículas ya formadas a los antibióticos, para cada cepa se retiró uno de los salientes que servirían como control positivo. Este control se tiñó con 2 mL de naranja de Acridina (BD, Estados Unidos) durante dos minutos y tras lavar dos veces con agua destilada estéril se observó al microscopio de fluorescencia a 40x para comprobar la correcta formación de la biopelícula.

A continuación se procedió a la exposición de las biopelículas a las distintas concentraciones de antibiótico pasando la tapa de la placa *MBEC*® *device* a una placa P-96 en la que previamente se habían preparado las diluciones seriadas correspondientes, a un volumen de 200 µL/pocillo. El rango de concentraciones ensayado para todos los antibióticos fue de 1024-8 mg/L, excepto para la rifampicina, que fue de 64-0,5 mg/L.

Al igual que para la determinación de la CMI, el medio MH-II empleado para las diluciones de daptomicina se suplementó con CaCl₂ a 50 mg/L, mientras que para la fosfomicina se suplementó con glucosa-6-fosfato (25 mg/L). Igualmente, se incluyó un control negativo en todos los ensayos (medio MH-II sin bacteria).

Las biopelículas expuestas a los antibióticos se incubaron durante otras 24 horas a 36°C, esta vez sin agitación. A continuación se procedió a realizar dos lavados

en PBS y se traspasó la tapa con las biopelículas a una placa con medio MH-II estéril. Esta se sonicó durante 5 minutos, y se incubó durante 24 horas más a 36°C. A las 24 horas se procedió a la lectura de la CMEB como si de una CMI convencional se tratara.

3.4.4.2. Estudios con combinación de compuestos

Al igual que en el apartado anterior, la determinación de la CMEB para las combinaciones de los distintos compuestos se determinó mediante la técnica de Calgary utilizando las placas *MBEC*[®] device y siguiendo el mismo protocolo de inoculación. La preparación de las placas con los compuestos para exponer las biopelículas en este caso se realizó de la siguiente manera: las diluciones seriadas de los antibióticos a testar se prepararon al doble de la concentración deseada y a un volumen de 100 µL/pocillo. Posteriormente se añadieron 100 µL del doble de la concentración de NAC determinada previamente o eritromicina sub-MIC, según correspondiese al ensayo dando lugar a un volumen final por pocillo de 200 µL. Tras exponer las biopelículas a estas combinaciones se procedió con el protocolo de acuerdo a lo indicado en el apartado anterior.

Posteriormente se compararon los resultados obtenidos para un solo antibiótico con los obtenidos con las combinaciones de compuestos, observando posibles diferencias.

3.5. ENSAYO CON PÉPTIDO INHIBIDOR DEL *QUORUM SENSING*

Además de los estudios de sensibilidad a antimicrobianos en biopelículas, se quiso estudiar la posible efectividad del péptido *RIP* (YSPWTNF-NH₂) como inhibidor de la formación de biopelícula. Para ello se emplearon las cepas control *S. aureus* 15981 y *S. epidermidis* ATCC 35984 y una cepa clínica formadora de biopelícula de cada especie.

Este ensayo se realizó mediante las técnicas de MtP y de Stepanovic anteriormente detalladas, añadiendo a cada pocillo 10 µL de *RIP* 1mg/mL e incluyendo controles negativos (medio MH-II estéril sin bacteria + *RIP* 1mg/mL). Cada ensayo se realizó por duplicado, incluyendo 3 repeticiones para cada cepa en cada uno de los ensayos.

3.6. BIOCERÁMICAS MESOPOROSAS COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

En esta parte del estudio se empleó un material mesoporoso de sílice, en concreto SBA-15, como sistema de liberación de tres antibióticos con buena actividad frente a los principales patógenos causantes de infecciones osteoarticulares.

Los antibióticos utilizados fueron rifampicina, vancomicina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y linezolid (Pfizer, Estados Unidos), tanto de manera individual como en combinación. Tras la liberación se analizó la actividad biológica del antibiótico liberado.

Las piezas de SBA-15, de 6 mm de espesor y 150 mg de peso, fueron fabricadas según el protocolo descrito por Zhao et al. (128) y proporcionadas por el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

3.6.1. CARGA DE ANTIBIÓTICOS EN LAS MATRICES SBA-15

Antes de proceder a la carga de las piezas de SBA-15 se preparó un stock de 1000 mg/L de cada antibiótico y a partir de estos se prepararon las correspondientes combinaciones con las que se cargaron las piezas del material mesoporoso SBA-15.

Las combinaciones de los distintos antibióticos se prepararon como se detalla a continuación:

- Para las piezas con un solo antibiótico: se preparó una solución con $\frac{1}{3}$ vol. del stock del antibiótico correspondiente y $\frac{2}{3}$ vol. de PBS (2 mL del stock + 4 mL de PBS).
- Para las piezas con combinación de dos antibióticos (rifampicina+vancomicina/ rifampicina+linezolid/ vancomicina+linezolid) se preparó una solución con $\frac{1}{3}$ vol. de cada antibiótico + $\frac{1}{3}$ vol. de PBS (2 mL de cada stock+2 mL de PBS).
- Para las piezas con la combinación de los tres antibióticos se preparó una solución con $\frac{1}{3}$ vol. de cada antibiótico (2 mL de cada stock).

Todas las combinaciones de carga se realizaron por triplicado, por lo que se prepararon 21 muestras del material SBA-15 (3 para cada antibiótico por separado; 3 para las combinaciones de dos antibióticos y 3 con la combinación de los tres antibióticos).

Las piezas de SBA-15 se depositaron en los pocillos de una placa P-24 estéril y a cada pocillo se le añadió 1 mL de la preparación de antibióticos correspondiente. Estos discos se mantuvieron sumergidos en la solución a 4°C y en agitación durante 24 horas. A continuación se muestra un esquema de las distintas combinaciones.

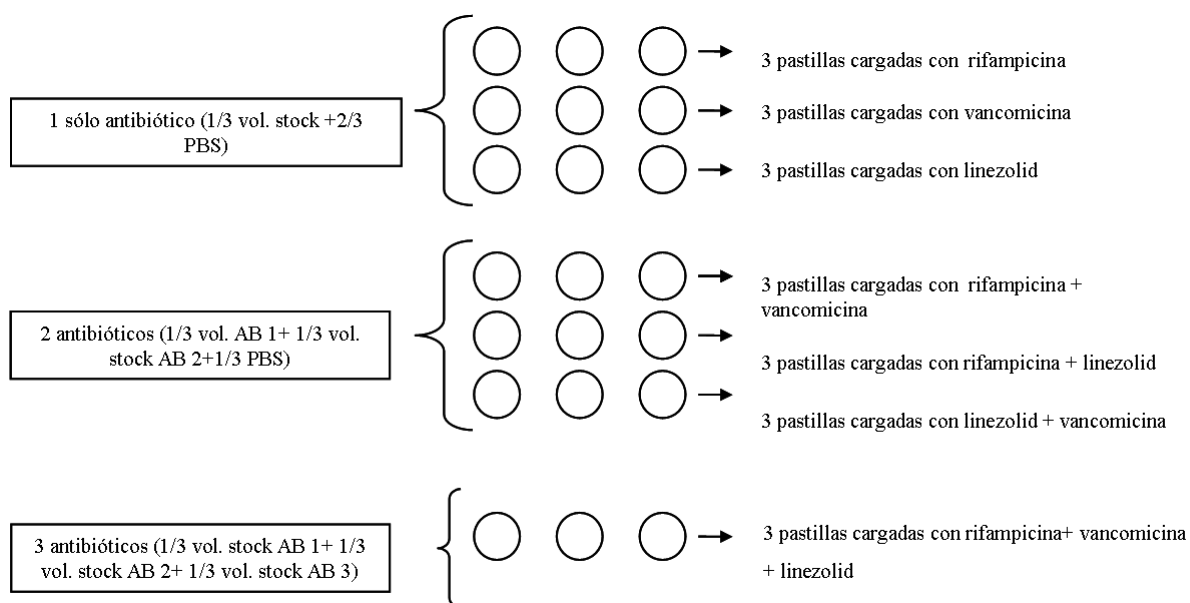


Figura 7. Esquema de carga con las distintas combinaciones de antibióticos en las piezas de SBA-15.

Transcurridas las 24 horas, las piezas se traspasaron a otra placa estéril y se dejaron secar durante 24 horas a 4°C.

3.6.2. LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS DESDE LAS MATRICES SBA-15 Y MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LIBERADA

Tras realizar la carga de las distintas combinaciones de antibióticos en las muestras de SBA-15 se llevó a cabo la liberación a distintos tiempos. Para ello cada pieza se sumergió en 3 mL de PBS y se fueron tomando alícuotas de 150 μ L a los 15, 30 minutos, 1, 3, 6 y 24 horas. Se tomaron dos alícuotas de cada muestra para realizar por un lado la medición de la concentración liberada y por otro la medida de la actividad biológica. Estas alícuotas se conservaron congeladas a -20°C.

La concentración de antibiótico liberado se analizó mediante HPLC (Waters Alliance, Estados Unidos), controlado por el programa informático Empower2. (Waters Alliance, Estados Unidos). Para la separación cromatográfica de los distintos antibióticos se utilizó una columna MediterraneaTM Sea₁₈ de 150 \times 4.6 mm (Teknokroma, España), y como fase móvil se utilizó una mezcla de KH₂PO₄-K₂HPO₄ 20 mM a pH 6,9 y acetonitrilo (88:12, v/v), a un flujo de 1 mL/ min a 37°C. Como volumen de inyección se establecieron 10 μ L y para cada muestra se realizaron 3 mediciones. La detección se realizó mediante ultravioleta a distintas longitudes de onda para cada antibiótico: 199 nm para la rifampicina, 200 nm para la vancomicina y 250 nm para el linezolid. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención fueron los siguientes: 2,5 minutos para la rifampicina; 7,3 minutos para la vancomicina y 11,6 minutos para el linezolid.

Antes de realizar las mediciones de las muestras liberadas desde las piezas del material mesoporoso se realizó una recta patrón con concentraciones de cada antibiótico conocidas.

Los resultados obtenidos por HPLC se procesaron con el programa informático OriginPro8 (OriginLab, Estados Unidos).

3.6.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANTIBIÓTICO LIBERADO

Tras el proceso de carga y liberación desde el material mesoporoso se analizó la actividad biológica de los antibióticos para determinar la presencia de alguna modificación en durante el proceso mediante un bioensayo.

Para analizar la actividad biológica de la rifampicina y el linezolid liberados desde las matrices de SBA-15 se utilizó la cepa de colección *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, mientras que para la medición de la vancomicina se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

De manera previa a la medición de las muestras liberadas desde el material se realizó una recta patrón con concentraciones de antibiótico conocidas y siguiendo el mismo procedimiento que se iba a realizar para las muestras.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: en primer lugar se prepararon 20 placas con agar Antibiotic Medium 2 (BD, Estados Unidos) en las que se inoculó la correspondiente bacteria antes de solidificar, de modo que creciese en

ella tras la incubación un césped bacteriano. En cada placa se colocaron unos discos de celulosa estériles de 6 mm de diámetro sobre los cuales se añadieron 20 μ L de las alícuotas correspondientes obtenidas previamente. Estas placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, tras las cuales se procedió a la medición de los halos de inhibición y comparación con los patrones previamente realizados. Los experimentos se realizaron de manera separada y por triplicado.

4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COMERCIAL DE PCR-HIBRIDACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Para la evaluación de este sistema se estudiaron 258 implantes: 84 prótesis de cadera, 101 prótesis de rodilla, 41 clavos y 32 piezas de diverso material de osteosíntesis (placas, tornillos, etc.). Todos estos implantes fueron obtenidos a partir de 126 pacientes, 47 de los cuales habían sido diagnosticados de infección asociada a material protésico según criterios clínicos, correspondiendo a 109 de las 258 muestras (41 prótesis de cadera, 46 prótesis de rodilla, 11 clavos y 11 piezas de material de osteosíntesis).

Entre los 47 pacientes diagnosticados, 32 habían seguido un tratamiento previo con antibióticos. Por otra parte, de los otros 79 pacientes sin diagnóstico clínico de infección, 15 habían seguido también un tratamiento con antibióticos debido a otros procesos infecciosos.

En las 109 muestras procedentes de pacientes con infección 72 tuvieron un cultivo positivo, 5 de los cuales se consideraron posibles contaminaciones, y 78 tuvieron un resultado positivo mediante PCR-hibridación; es decir se detectó el 61,5% de las muestras con infección mediante cultivo y el 71,6% mediante PCR-hibridación, por lo que este sistema tuvo una mayor sensibilidad a la hora de detectar las infecciones asociadas a implante. Teniendo en cuenta ambas técnicas, 59 de las 109 muestras (16 de ellas casos de infecciones polimicrobianas)

dieron resultado positivo tanto mediante cultivo como por PCR-hibridación, 54 de ellas con coincidencia en la detección de la especie (49,5% del total).

Por otra parte, entre las 149 muestras de pacientes sin infección (43 prótesis de cadera, 55 prótesis de rodilla, 30 clavos y 21 piezas de material de osteosíntesis), se hallaron 21 casos de cultivo positivo, 11 de los cuales se consideraron contaminaciones, y 27 con resultado positivo mediante PCR-hibridación. Por lo tanto el 6,7% de las muestras consideradas no infectadas según criterios clínicos se consideraron positivas para infección mediante cultivo y mediante PCR-hibridación el 18,1%. De especial interés es la detección de 2 muestras positivas mediante ambas técnicas, ambas procedentes de prótesis de cadera (1 *S. epidermidis* y 1 *S. pyogenes*). A continuación se muestra el resumen de los resultados obtenidos mediante ambas técnicas.

Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos mediante cultivo y PCR-hibridación.

	Nº total de muestras	PCR		Cultivo	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Infección clínica					
Si	109	78	31	67	42
No	149	27	122	10	139
Cultivo					
Positivo	77	59	18		
Negativo	181	46	135		

4.1.1. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

En cuanto al diagnóstico microbiológico mediante cultivo (tabla 5), *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron los microorganismos más frecuentemente aislados en el conjunto de las muestras, encontrándose en 21 y 29 muestras respectivamente. En el caso de *S. aureus*, 20 de las muestras pertenecían a pacientes diagnosticados de infección, mientras que sólo uno pertenecía a un paciente sin infección aparente. Esta especie fue la única que se encontró en todos los tipos de implantes analizados. Por otra parte, en el caso de *S. epidermidis* 26 de las 29 muestras pertenecían a pacientes diagnosticados de infección y 3 a no infectados.

Respecto al hallazgo de infecciones polimicrobianas, se identificaron 24 casos en las 109 muestras con diagnóstico clínico de infección.

El recuento medio fue de 44×10^3 ufc/mL (rango: 50 a $>10^5$), y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de las muestras procedentes de pacientes diagnosticados de infección (media: 44×10^3 ufc/mL) y en aquellos sin dicho diagnóstico (media: 46×10^3 ufc/mL). Asimismo, tampoco se encontraron diferencias significativas en los recuentos entre las muestras de pacientes que habían seguido un tratamiento antibiótico previo y aquellos en los que no se dio esta circunstancia (media de recuentos: 49×10^3 ufc/mL y 36×10^3 ufc/mL respectivamente; prueba ANOVA; $p = 0,4$).

Tabla 5. Especies aisladas mediante cultivo convencional.

Bacterias	Implante ortopédico (nº de muestras)				TOTAL
	Cadera	Rodilla	Clavos	Osteosíntesis	
<i>S. aureus</i>	9	4	4	4	21
<i>S. epidermidis</i>	20	5	4	-	29
<i>S. warneri</i>	2	-	2	-	4
<i>S. hominis</i>	3	-	-	-	3
<i>S. lugdunensis</i> **	4	-	-	1	5
<i>S. milleri</i> **	-	-	2	-	2
<i>S. pyogenes</i>	1	-	-	-	1
<i>K. pneumoniae</i>	-	4	-	-	4
<i>M. abscessus</i> **	1	-	-	-	1
<i>M. fortuitum</i> **	-	-	1*	1*	2*
<i>Corynebacterium sp.</i> **	-	-	-	1	1
<i>E. coli</i>	-	2	-	1	3
<i>Enterococcus sp.</i> **	-	-	-	1	1
<i>E. aerogenes</i>	4	-	-	-	4
<i>E. faecalis</i>	-	-	1	1	2
<i>B. fragilis</i> **	2	-	-	-	2
<i>P. stuartii</i> **	-	-	1	-	1
<i>P. prevotii</i> **	-	-	1	-	1
Otros anaerobios	-	-	4	1	5
<i>Micrococcus sp.</i> **	-	-	1*	-	1*
<i>P. acnes</i> **	1*	-	2	1	4 (1*)
<i>P. aeruginosa</i>	2 (1*)	4	-	-	6 (1*)
<i>P. stutzeri</i> **	-	-	1*	-	1*
<i>R. picketii</i> **	-	5 (2*)	-	-	5 (2*)
<i>Bacillus sp.</i> **	-	-	1	-	1
<i>Burkholderia sp.</i> **	4*	-	-	1*	5*
<i>S. maltophilia</i> **	1	-	-	1*	2(1*)
<i>S. paucimobilis</i> **	-	-	1*	-	1*
<i>Pasteurella sp.</i> **	-	1*	-	-	1*
<i>Prevotella sp.</i> **	1	-	-	-	1
Hongos					
<i>Candida sp.</i> **	-	-	1	-	1
<i>A. terreus</i> **	2	-	-	-	2

*Microorganismos contaminantes (sin relevancia clínica, recuentos bajos).

** Microorganismos no detectados mediante PCR-hibridación.

Respecto al diagnóstico microbiológico mediante el sistema de PCR-hibridación (tabla 6) se observó que, al igual que en la técnica de cultivo, las dos especies presentes en un mayor número de muestras fueron *S. aureus* y *S. epidermidis*, aunque mediante esta técnica el número de casos fue más elevado (34 *S. aureus* y 42 *S. epidermidis*). Entre los 34 casos de *S. aureus*, 24 pertenecían a muestras de pacientes diagnosticados de infección, mientras que para *S. epidermidis* fueron 32 de los 42 casos encontrados. En este caso, ambas especies se encontraron en todos los tipos de implantes.

Tabla 6. Especies detectadas mediante el sistema de PCR-hibridación.

Bacterias	Implante ortopédico (nº de muestras)				
	Cadera	Rodilla	Clavos	Osteosíntesis	TOTAL
<i>S. aureus</i>	8	15	5	6	34
<i>S. epidermidis</i>	23	17	1	1	42
<i>S. warneri</i>	-	1	-	-	1
<i>S. hominis</i>	-	3	-	-	3
<i>S. pyogenes</i>	2	-	-	-	2
<i>Streptococcus sp.</i> *	-	-	2	-	2
<i>H. influenzae</i> *	-	-	2	-	2
<i>K. pneumoniae</i>	-	4	-	-	4
<i>E. coli</i>	-	3	-	2	5
<i>E. cloacae/E.aerogenes</i>	5	1	-	2	8
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	1	1
<i>E. casseliflavus</i> *	-	-	-	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	2	5	-	-	7
<i>P. mirabilis</i> *	2	-	-	-	2

* Especies no detectadas mediante cultivo

Por otra parte, los pacientes se dividieron en dos grupos, aquellos con implantes protésicos y aquellos con material de osteosíntesis o clavos, y se estudiaron por separado para analizar la existencia de posibles diferencias según el tipo de infección. En ambos grupos se excluyeron aquellos casos con sospecha de contaminación.

4.1.2. PRÓTESIS ARTICULARES

Entre los 47 pacientes con diagnóstico clínico de infección en el inicio, en 31 de ellos esta iba asociada a prótesis de cadera o rodilla. Tras realizar el cultivo y la técnica de PCR-hibridación se observó que 28 de los 31 también fueron diagnosticados como positivos para infección mediante ambas técnicas, 24 sólo por cultivo y 26 sólo por PCR. Por lo tanto, mediante PCR-hibridación se detectaron más muestras positivas que mediante el cultivo convencional (Tablas 7 y 8).

Considerando aquellos pacientes con prótesis articular y clasificados en un principio como no infectados (44 pacientes), la combinación de ambas técnicas dio resultado positivo en 17 casos. Curiosamente, en 7 pacientes sin diagnóstico de infección y con cultivo negativo, el resultado de PCR-hibridación fue positivo para *S. aureus*.

Al analizar el efecto de la terapia antibiótica previa se observó que 14 de los 20 pacientes con diagnóstico de infección asociada a prótesis tuvieron un resultado positivo en el cultivo convencional, mientras que para la prueba de PCR-hibridación fueron 16.

Todos los casos de cultivo positivo también fueron positivos para PCR-hibridación, y 2 casos más fueron positivos únicamente para esta prueba. Entre los pacientes no diagnosticados pero con tratamiento antibiótico previo únicamente apareció un caso positivo para cultivo, y 2 para PCR-hibridación, siendo uno de ellos también positivo para cultivo.

4.1.3. MATERIAL DE OSTEOSÍNTESIS Y CLAVOS

La combinación de los resultados en ambas técnicas dio resultados positivos en 13 pacientes originalmente diagnosticados como infectados (todos los casos positivos para PCR lo fueron también para cultivo) y en 14 no diagnosticados (2 de ellos fueron positivos para ambas técnicas).

Entre los 51 pacientes totales con implantes de osteosíntesis o clavos, 22 habían recibido tratamiento antibiótico previo, de los cuales 12 habían sido diagnosticados de infección asociada al implante. De esos 12 casos, 9 mostraron resultado positivo en cultivo y 7 en la técnica molecular. De los otros 10 pacientes no diagnosticados pero que habían recibido tratamiento por otras causas, 2 mostraron resultados positivos en cultivo y 5 en la técnica de PCR.

En las dos tablas siguientes se muestran los resultados obtenidos mediante las dos técnicas empleadas teniendo en cuenta el número de pacientes según tipo de implante y diagnóstico clínico.

Tabla 7. Resultados obtenidos para los pacientes según el tipo de implante con ambas técnicas.

Nº pacientes según tipo de implante	Nº total de casos	Cultivo		PCR	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Todos los pacientes con artroplastia	75	29	46	40	35
Todos los pacientes con fractura (clavos y/o osteosíntesis)	51	16	35	16	35
Total de pacientes	126	45	81	56	70

Tabla 8. Resultados obtenidos para los pacientes según el diagnóstico clínico.

Nº pacientes según diagnóstico y tipo de implante	Nº total de casos	Cultivo		PCR	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Casos de artroplastia con infección clínica	31	24	7	26	5
Casos de artroplastia sin infección clínica	44	5	39	14	30
Casos de fractura con infección clínica	16	12	4	8	8
Casos de fractura sin infección clínica	35	4	31	8	27
Pacientes con diagnóstico clínico de infección	47	36	11	34	13
Pacientes sin diagnóstico clínico de infección	79	9	70	22	57

4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULA

Las 32 cepas clínicas estudiadas de las especies *S. aureus* y *S. epidermidis* se consideraron positivas para la formación de biopelícula tras analizarlas mediante todas las técnicas.

La sensibilidad global del método de Stepanovic fue del 93,8%, de MtP 68,8 % y de CLSM 56,3%, por lo que la técnica de Stepanovic resultó ser la más sensible a la hora de detectar la formación de biopelículas en las cepas del presente estudio.

Al final del apartado se muestra el resumen de los resultados para todas las cepas de cada especie (Tablas 9 y 10). La evaluación de las distintas técnicas de forma individualizada se muestra a continuación.

4.2.1. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LOS GENES *ica* A, *ica* D e *ica* R POR PCR

Para cada cepa se analizó la presencia de los genes *ica* A (188 pb), *ica* D (198 pb) e *ica* R (453 pb) por separado y de manera independiente.

Los resultados obtenidos demostraron que 21 de las 32 cepas clínicas estudiadas (65,6%) poseen alguno de los genes *ica* seleccionados. Entre esas 21 cepas, 16 pertenecen a la especie *S. aureus* y 5 a *S. epidermidis*.

Se observó que únicamente 6 cepas presentaron un resultado positivo para los 3 genes analizados (2 *S. aureus* y 4 *S. epidermidis*) constituyendo el 18,8% del total de las cepas estudiadas. La sensibilidad de la técnica por especie fue del 11,8% para *S. aureus* y 26,7% para *S. epidermidis*.

No encontraron diferencias estadísticamente significativas en la detección de ninguno de los genes *ica* entre ambas especies (prueba de Fisher: $p=0,9$ para *ica* A, $p=0,1$ para *ica* D y $p=0,4$ para *ica* R).

4.2.2. TEST MtP

En función de los resultados, las cepas clínicas estudiadas se clasificaron como formadoras o no formadoras de biopelícula. Los datos de D.O. obtenidos para cada cepa se interpretaron de acuerdo a la D.O. control obtenida en cada experimento.

De las 32 cepas clínicas, 22 se consideraron positivas para la formación de biopelícula mediante esta técnica, constituyendo el 68,75 % del total de cepas estudiadas. De especial interés es el resultado obtenido para una de las cepas pertenecientes a la especie *S. aureus* (P-95), con un valor de D.O. muy superior al resto de las cepas analizadas.

Analizando los resultados en cada especie por separado, se observó que el 70,6% de las cepas de *S. aureus* (12 de 17) y el 66,7% de *S. epidermidis* (10 de 15) se consideraron formadoras de biopelícula mediante esta técnica.

Al hacer la comparación entre ambas especies se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* (prueba de Mann-Whitney; $p = 0,8$).

4.2.3. TEST DE STEPANOVIC

De manera similar al test MtP, los resultados de D.O. obtenidos para cada cepa se analizaron de acuerdo a su control negativo correspondiente. Esta técnica, a diferencia de la anteriormente citada, permite cuantificar el grado de formación de biopelícula y por lo tanto clasificar las cepas según dicha graduación.

El 93,8% de las cepas mostraron la capacidad de formar biopelícula en distinto grado y únicamente una cepa de cada especie se clasificó como no formadora de biopelícula según los resultados obtenidos (clasificación 0).

Analizando los datos obtenidos dentro de cada especie, 13 cepas de *S. aureus* se clasificaron como formadoras débiles de biopelícula (clasificación 1/+) y 2 cepas como formadoras moderadas de biopelícula (clasificación 2/++), mientras que únicamente la cepa control *S. aureus* 15981 se clasificó como formadora fuerte de biopelícula (clasificación 3/+++).

En relación con las cepas pertenecientes a la especie *S. epidermidis* se clasificaron 7 cepas como formadoras débiles, 3 con formación moderada y 4 como formadoras fuertes de biopelícula. Curiosamente, la cepa control ATCC 35984 mostró la clasificación 1 en la formación de biopelícula mediante este método.

Observando los resultados obtenidos la sensibilidad de esta técnica por especie fue del 94,1% para *S. aureus* y del 93,3% para *S. epidermidis*.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las dos especies (prueba de Mann-Whitney; $p=0,4$).

4.2.4. CLSM

La técnica de CLSM permitió observar la formación de una biopelícula en 19 de las 32 cepas estudiadas, es decir, en un 59,4% del total. Entre estas 19 cepas, 8 corresponden a la especie *S. aureus* y 11 a *S. epidermidis*. Por lo tanto, la técnica detectó un 47,1% de las cepas correspondientes a la especie *S. aureus* formadoras de biopelícula y un 73,3% de las cepas de *S. epidermidis*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies (prueba de Mann-Whitney, $p=0,2$).

A continuación se muestran las imágenes obtenidas mediante CLSM en algunas de las cepas.

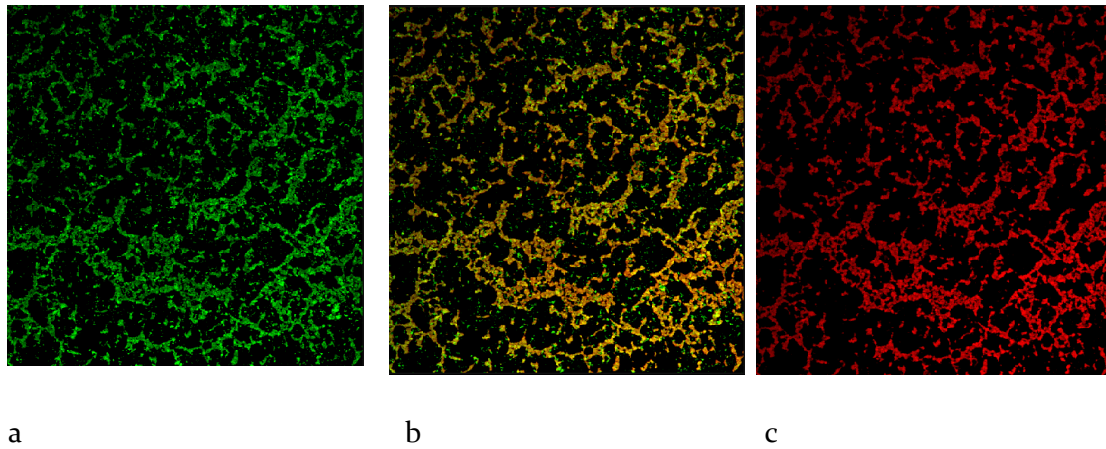


Figura 8. Observación por CLSM de la biopelícula formada por la cepa P- 1 (*S. aureus*)

En verde (a) se observan las bacterias vivas, mientras que en rojo se muestran las muertas (c). En el centro se muestra la superposición de ambas (b) (40x).

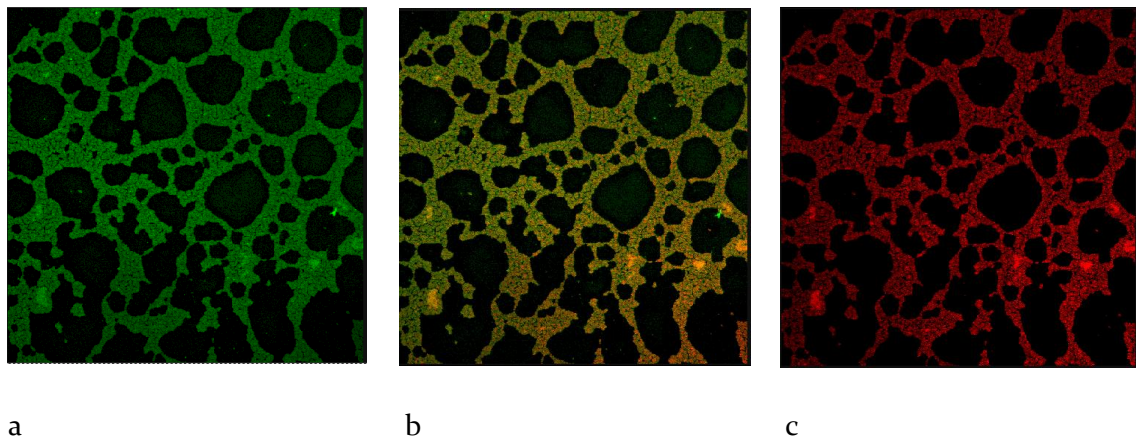


Figura 9. Observación por CLSM de la de la biopelícula formada por la cepa P-33.1 (*S.epidermidis*)

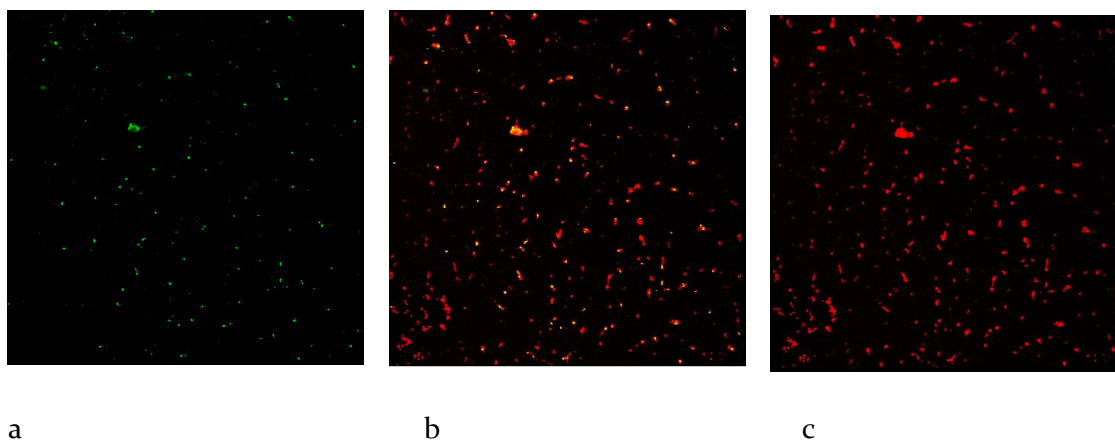


Figura 10. Observación por CLSM de la cepa P-6iT4 (*S.aureus*), negativa para la formación de biopelícula

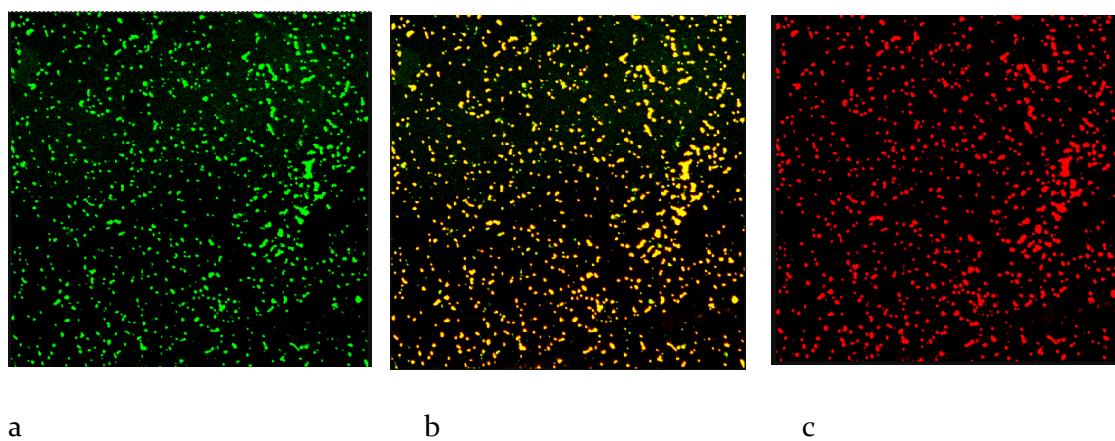


Figura 11. Observación por CLSM de la cepa P-74 (*S.epidermidis*), negativa para la formación de biopelícula

Tabla 9. Resultados obtenidos en el estudio de formación de biopelícula en las cepas de *S. aureus*.

CEPA	D.O.(MtP)	STEPANOVIC	CLSM	ica A	ica D	ica R
15981	0,328	3/+++	+	+	+	+
P-1	0,232	1/+	+	+	+	+
P-2	0,139	1/+	+	-	+	-
P-4	0,196	2/++	-	-	+	-
P-18	0,128	1/+	+	-	+	-
P-19	0,134	1/+	-	-	+	-
P-41	0,122	1/+	-	-	+	-
P-61T3	0,172	0	-	+	-	-
P-61T4	0,151	1/+	-	+	-	-
P-62A	0,161	1/+	+	+	-	-
P-68	0,155	1/+	-	+	-	-
P-82.1	0,16	1/+	-	-	+	-
P-95	1,109	0	-	+	+	+
P-104.1	0,111	1/+	+	-	+	-
P-112	0,092	1/+	+	-	+	-
P-138	0,124	1/+	+	-	+	-
P-251	0,098	2/++	-	-	-	-
P-272.1	0,082	1/+	+	-	+	-

Tabla 10. Resultados obtenidos en el estudio de formación de biopelícula en las cepas de *S. epidermidis*.

CEPA	D.O.(MtP)	STEPANOVIC	CLSM	ica A	ica D	ica R
ATCC						
35984	0,134	1/+	+	+	+	+
P-6.5	0,234	3/+++	+	-	+	-
P-23.2	0,136	1/+	-	-	-	-
P-33.1	0,256	3/+++	+	-	-	-
P-53B	0,206	2/++	+	+	+	+
P-55	0,209	1/+	+	+	+	+
P-61T1	0,146	1/+	-	-	-	-
P-61T2	0,139	1/+	+	-	-	-
P-74	0,297	1/+	-	+	+	+
P-101	0,236	0	+	-	-	-
P-146B	0,1	3/+++	+	-	-	-
P-146G	0,088	1/+	-	-	-	-
P-194	0,175	3/+++	+	+	+	+
P-223	0,104	2/++	+	-	-	-
P-236	0,101	2/++	+	-	-	-
P-281	0,065	1/+	+	-	-	-

4.3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD *IN VITRO*

Al final del apartado se muestran los resultados detallados para cada cepa en todos los estudios de sensibilidad realizados (tablas 17-26). A continuación se muestran los resultados globales para cada estudio concreto.

4.3.1. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BACTERIAS PLANCTÓNICAS

En las tablas 12 y 13 pueden observarse los resultados obtenidos para *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente.

Los antibióticos con mayor actividad antimicrobiana frente a las cepas analizadas de ambas especies fueron tigeciclina, daptomicina y linezolid, con valores muy bajos de CMI₉₀ (0,5, 1 y 2 mg/L en *S. aureus* y 0,25, 1 y 2 mg/L en *S. epidermidis* respectivamente) y sin ningún caso de resistencia.

También se obtuvieron buenos resultados con vancomicina y fosfomicina (CMI₉₀ de 2 y 16 mg/L para *S. aureus*; 4 mg/L en ambos para *S. epidermidis*). En el caso de estos dos antibióticos, sólo se encontró una cepa resistente para ambos antibióticos en *S. aureus*, mientras que todas las cepas de *S. epidermidis* fueron sensibles a ambos compuestos.

Otro antibiótico con buena actividad en todas las cepas, especialmente en las cepas de *S. epidermidis* (CMI₉₀ de 0,015 mg/L) fue rifampicina, con bajas tasas de resistencia.

Clindamicina y cotrimoxazol mostraron una mayor actividad antibacteriana para las cepas de *S. aureus* que para *S. epidermidis*, con diferencias bastante importantes en cuanto a los porcentajes de resistencia (11,11 y 5,56% en *S. aureus* y mayor del 30% en ambas para *S. epidermidis*).

Por el contrario, ciprofloxacino y cloxacilina demostraron tener poca actividad antimicrobiana en las cepas estudiadas, con valores de CMI₉₀ superiores a la concentración analizada más alta en ambos antibióticos, y porcentajes de resistencia cercanos o superiores al 50% en ambas especies.

Es de especial interés el elevado número de SAMR encontrados entre las cepas estudiadas y que se correlaciona con el alto porcentaje de resistencia a ciprofloxacino (66,67%).

Por otra parte, las tasas de actividad bactericida demostraron el comportamiento principalmente bacteriostático de rifampicina, tigeciclina, clindamicina, cotrimoxazol y fosfomicina en un gran número de cepas. El único antibiótico que claramente demostró ser bacteriostático en todas las cepas fue linezolid. Sin embargo, ciprofloxacino y daptomicina mostraron actividad bactericida para la mayoría de las cepas analizadas, con porcentajes superiores al 65%, mientras que vancomicina y cloxacilina mostraron resultados cepa-dependientes.

Tras la determinación de la CMI y CMB para los 10 antibióticos del estudio se realizó la determinación de la CMI para NAC y eritromicina de cara al estudio de combinación de compuestos en biopelículas. La CMI de NAC para todas las cepas

se situó entre 2048 y 4096 mg/L, mientras que para eritromicina se situó entre 0,25-0,5 mg/L para *S. aureus* y entre 0,12-0,25 mg/L para *S. epidermidis* en aquellas cepas sensibles a este antibiótico. Por ello, la concentración de NAC establecida para posteriores estudios fue de 1024 mg/L, mientras que la concentración subinhibitoria de eritromicina se estableció en 0,06 mg/L. A continuación se muestran los resultados en todas las cepas, expresados en mg/L.

Tabla 11. Datos de CMI obtenidos en el estudio de sensibilidad para NAC y eritromicina.

<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>		
CEPA	NAC	ERITROMICINA	CEPA	NAC	ERITROMICINA
P-1	4096	>32	P-6.5	4096	>32
P-2	4096	>32	P-23.2	4096	>32
P-4	4096	>32	P-33.1	4096	0,25
P-18	4096	>32	P-53B	4096	0,25
P-19	4096	>32	P-55	4096	0,25
P-41	4096	>32	P-61T1	4096	>32
P-61T3	2048	0,5	P-61T2	4096	>32
P-61T4	4096	0,5	P-74	4096	>32
P-62A	4096	0,5	P-101	4096	0,25
P-68	4096	>32	P-146G	4096	>32
P-82.1	4096	>32	P-146B	4096	>32
P-95	2048	0,25	P-194	4096	0,12
P-104.1	4096	0,5	P-223	2048	0,12
P-112	4096	>32	P-236	2048	>32
P-138	4096	0,5	P-281	2048	>32
P-251	4096	0,25			
P-272.1	4096	0,5			

Tabla 12. Resultados del estudio de sensibilidad en las cepas de *S. aureus*.

ANTIBIÓTICO	CMI (mg/L)			CMB (mg/L)			% DE RESISTENCIA		% ACTIVIDAD BACTERICIDA
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	RANGO	CMB ₅₀	CMB ₉₀	RANGO	CLSI	EUCAST	
RIFAMPICINA	0,015	4	0,007- >8	2	>8	0,25- >8	11,11	16,67	0
VANCOMICINA	1	2	0,5- 4	4	16	0,5- 16	5,56	5,56	55,56
TIGECICLINA	0,25	0,5	0,12- 0,5	4	>8	1- >8	-	0	0
CLINDAMICINA	0,12	>8	0,12- >8	4	>8	0,5- >8	11,11	11,11	0
COTRIMOXAZOL	1	2	0,5- 8	4	32	1- >32	5,56	5,56	27,78
CIPROFLOXACINO	>8	>8	0,12- >8	>8	>8	0,5- >8	66,67	66,67	66,67
CLOXACILINA	>32	>32	0,25- >32	>32	>32	0,25- >32	66,67	66,67	50
DAPTOMICINA	0,5	1	0,5- 1	1	2	0,5- 4	0	0	77,78
FOSFOMICINA	1	16	0,5- 128	64	128	8- >128	-	5,56	0
LINEZOLID	2	2	1-2	>32	>32	32- >32	0	0	0

Tabla 13. Resultados del estudio de sensibilidad en las cepas de *S. epidermidis*.

ANTIBIÓTICO	CMI (mg/L)			CMB (mg/L)			% DE RESISTENCIA		% ACTIVIDAD BACTERICIDA
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	RANGO	CMB ₅₀	CMB ₉₀	RANGO	CLSI	EUCAST	
RIFAMPICINA	0.015	0.015	0,004- 8	0.06	0.5	0,015- >8	5,26	5,26	27,78
VANCOMICINA	2	4	1-4	2	4	1-8	0	0	94,74
TIGECICLINA	0.12	0.25	0,06- 0,25	8	>8	0,25- >8	-	0	73,33
CLINDAMICINA	0.12	>8	0,12- >8	4	>8	0,5- >8	31,58	36,84	7,69
COTRIMOXAZOL	2	>32	0,5- >32	16	>32	4- >32	42,1	42,1	6,25
CIPROFLOXACINO	0.5	>8	0,06- >8	1	>8	0,25- >8	47,37	47,37	73,33
CLOXACILINA	0.5	>32	0,12- >32	1	>32	0,25- >32	68,42	68,42	50
DAPTOMICINA	0.5	1	0,25- 1	1	1	0,5- 4	0	0	78,95
FOSFOMICINA	1	4	0,25- 4	6	64	2-64	-	0	5,26
LINEZOLID	1	2	0,5- 2	32	>32	≥32	0	0	0

4.3.2. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD EN BIOPELÍCULAS

4.3.2.1. Estudios con un solo compuesto

Todas las cepas estudiadas fueron capaces de formar una biopelícula *in vitro* mediante esta técnica, como se observó tras la tinción con naranja de Acridina de los controles para cada cepa y su posterior observación al microscopio de fluorescencia (40X).

En la tabla 14 se observan los resultados del estudio de sensibilidad en biopelículas. Teniendo en cuenta dichos datos, ninguno de los 10 antibióticos seleccionados fue totalmente efectivo a la hora de eliminar las biopelículas formadas por las cepas del estudio en ambas especies en las condiciones del experimento. Estos resultados se encuentran muy por encima de los datos de CMI obtenidos para las mismas cepas, con CMEB ≥ 1024 mg/L en la mayoría de los casos. Aún así, rifampicina y tigeciclina presentaron valores ligeramente inferiores al resto de los antibióticos (≥ 64 y 512 mg/L respectivamente en ambas especies).

De manera general, los resultados globales entre ambas especies fueron muy similares, aunque en el caso de las cepas pertenecientes a la especie *S. epidermidis*, los resultados variaron sustancialmente en función de la cepa. De especial interés son los resultados obtenidos para dos cepas de dicha especie (P-55 y P-223), que mostraron valores de CMEB inferiores a la mínima concentración estudiada para muchos de los antibióticos analizados.

Tabla 14. Resultados del estudio de sensibilidad en biopelículas.

ESPECIE ANTIBIÓTICO	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>		
	MBEC ₅₀ (mg/L)	MBEC ₉₀ (mg/L)	RANGO	MBEC ₅₀ (mg/L)	MBEC ₉₀ (mg/L)	RANGO
RIFAMPICINA	64	>64	≥64	32	64	≤0.5- >64
VANCOMICINA	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	<8- >1024
TIGECICLINA	512	512	128-512	256	512	<8- 512
CLINDAMICINA	>1024	>1024	≥1024	>1024	>1024	<8- >1024
COTRIMOXAZOL	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	16- >1024
CIPROFLOXACINO	>1024	>1024	≥1024	512	>1024	≤8- >1024
CLOXACILINA	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	≤8- >1024
DAPTOMICINA	>1024	>1024	≥1024	>1024	>1024	≤8- >1024
FOSFOMICINA	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	≤8- >1024
LINEZOLID	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	≥1024

4.3.2.2. . Estudios con combinación de compuestos

Todas las cepas de *S. aureus* mostraron resultados homogéneos, y la adición de NAC a 1024 mg/L o eritromicina a concentración subinhibitoria (0,06 mg/L) no demostró tener un claro efecto en la susceptibilidad de la biopelícula. De hecho, la combinación de tigeciclina con NAC incrementó la CMEB en la mayoría de las cepas.

Observando los resultados de *S. epidermidis* pudo comprobarse como estos fueron cepa-dependiente. La combinación con NAC pareció incrementar la CMEB para rifampicina tigeciclina y ciprofloxacino en algunas cepas. Por el contrario, se

observó una ligera disminución al combinar ese mismo compuesto con cloxacilina, daptomicina y fosfomicina.

La combinación de antibióticos con eritromicina únicamente resultó satisfactoria en algunos casos, y no se encontró una relación aparente entre la presencia de resistencia a eritromicina y resultado en la combinación con otros antibióticos.

De especial interés es la cepa P-23.2, que mostró una ligera disminución de la CMEB combinando ambos compuestos con muchos de los antibióticos analizados.

Los resultados de esta parte del estudio se muestran en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Resultados del estudio de sensibilidad en biopelículas para las combinaciones de antibióticos con NAC y eritromicina en *S. aureus*.

ESPECIE ANTIBIÓTICO	<i>S. aureus</i>					
	+NAC			+ ERITROMICINA		
	MBEC ₅₀	MBEC ₉₀	RANGO	MBEC ₅₀	MBEC ₉₀	RANGO
RIFAMPICINA	>64	>64	≥64	64	>64	≥64
VANCOMICINA	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
TIGECICLINA	>1024	>1024	512->1024	512	512	256->1024
CLINDAMICINA	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
COTRIMOXAZOL	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
CIPROFLOXACINO	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
CLOXACILINA	>1024	>1024	≥1024	>1024	>1024	≤8->1024
DAPTOMICINA	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
FOSFOMICINA	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
LINEZOLID	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024

Tabla 16. Resultados del estudio de sensibilidad en biopelículas para las combinaciones de antibióticos con NAC y eritromicina en *S. epidermidis*.

ESPECIE ANTIBIÓTICO	<i>S. epidermidis</i>					
	+NAC			+ERITROMICINA		
	MBEC ₅₀	MBEC ₉₀	RANGO	MBEC ₅₀	MBEC ₉₀	RANGO
RIFAMPICINA	64	>64	≤0,5->64	64	>64	1->64
VANCOMICINA	>1024	>1024	≤8->1024	>1024	>1024	≤8->1024
TIGECICLINA	>1024	>1024	≤8->1024	256	512	≤8-512
CLINDAMICINA	>1024	>1024	16->1024	>1024	>1024	16->1024
COTRIMOXAZOL	>1024	>1024	≤8->1024	>1024	>1024	16->1024
CIPROFLOXACINO	>1024	>1024	≤8->1024	>1024	>1024	≤8->1024
CLOXACILINA	>1024	>1024	≤8->1024	>1024	>1024	≤8->1024
DAPTOMICINA	>1024	>1024	≤8->1024	>1024	>1024	≤8->1024
FOSFOMICINA	>1024	>1024	≤8->1024	>1024	>1024	≤8->1024
LINEZOLID	>1024	>1024	32->1024	>1024	>024	16->1024

Tabla 17. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. aureus* (I).
(Datos expresados en mg/L).

ANTIBIÓTICO	RIFAMPICINA					VANCOMICINA				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
15981	0,007	2	64	64	64	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-1	0,015	4	64	>64	64	2	4	>1024	>1024	>1024
P-2	0,015	0,25	64	>64	64	1	2	>1024	>1024	>1024
P-4	0,015	4	64	>64	64	1	4	>1024	>1024	>1024
P-18	0,015	4	>64	>64	>64	1	2	>1024	>1024	>1024
P-19	>8	>8	>64	>64	>64	2	2	>1024	>1024	>1024
P-41	0,007	2	64	>64	64	2	4	>1024	>1024	>1024
P-61T3	0,015	2	64	>64	64	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-61T4	0,015	4	64	>64	>64	1	16	>1024	>1024	>1024
P-62A	0,015	4	64	>64	64	1	16	>1024	>1024	>1024
P-68	0,015	4	64	>64	64	1	2	>1024	>1024	>1024
P-82.1	4	>8	>64	>64	>64	2	8	>1024	>1024	>1024
P-95	0,12	>8	>64	>64	>64	1	1	>1024	>1024	>1024
P-104.1	0,015	1	64	>64	64	1	4	>1024	>1024	>1024
P-112	0,015	0,5	64	>64	64	1	4	>1024	>1024	>1024
P-138	0,03	0,5	64	>64	64	1	16	>1024	>1024	>1024
P-251	0,06	1	64	>64	>64	4	4	>1024	>1024	>1024
P-272.1	0,015	0,5	64	>64	>64	1	4	>1024	>1024	>1024

Tabla 18. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. aureus* (II).
(Datos expresados en mg/L).

ANTIBIÓTICO	TIGECICLINA					CLINDAMICINA				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
15981	0,12	1	512	>1024	512	0,12	1	>1024	>1024	>1024
P-1	0,25	2	512	>1024	256	0,12	2	>1024	>1024	>1024
P-2	0,12	>8	512	>1024	512	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-4	0,25	1	512	>1024	256	0,12	1	1024	>1024	>1024
P-18	0,25	>8	512	>1024	512	0,12	1	>1024	>1024	>1024
P-19	0,12	4	128	>1024	256	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-41	0,25	2	512	>1024	512	0,25	4	>1024	>1024	>1024
P-61T3	0,12	4	256	512	512	0,12	4	>1024	>1024	>1024
P-61T4	0,25	2	256	>1024	512	0,12	0,5	>1024	>1024	>1024
P-62A	0,25	4	256	>1024	256	0,12	1	>1024	>1024	>1024
P-68	0,25	4	512	>1024	>1024	0,25	2	>1024	>1024	>1024
P-82.1	0,12	4	512	>1024	256	0,12	2	>1024	>1024	>1024
P-95	0,12	>8	256	>1024	256	0,12	4	>1024	>1024	>1024
P-104.1	0,5	>8	512	>1024	512	0,12	>8	>1024	>1024	>1024
P-112	0,5	>8	512	>1024	512	0,12	>8	>1024	>1024	>1024
P-138	0,5	>8	512	>1024	512	0,25	>8	>1024	>1024	>1024
P-251	0,5	>8	512	>1024	512	0,12	4	>1024	>1024	>1024
P-272.1	0,5	>8	512	>1024	512	0,25	>8	>1024	>1024	>1024

Tabla 19. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. aureus* (III).
(Datos expresados en mg/L).

ANTIBIÓTICO	COTRIMOXAZOL					CIPROFLOXACINO				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
15981	2	8	>1024	>1024	>1024	0,25	0,5	1024	>1024	>1024
P-1	1	8	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-2	2	32	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-4	1	4	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-18	1	8	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-19	8	32	>1024	>1024	>1024	0,5	2	>1024	>1024	>1024
P-41	1	2	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-61T3	2	4	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-61T4	2	8	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-62A	2	4	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-68	1	8	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-82.1	1	4	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-95	1	>32	>1024	>1024	>1024	>8	>8	1024	>1024	>1024
P-104.1	0,5	4	>1024	>1024	>1024	0,5	1	>1024	>1024	>1024
P-112	1	4	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-138	1	2	>1024	>1024	>1024	0,12	1	1024	>1024	>1024
P-251	1	1	>1024	>1024	>1024	1	2	>1024	>1024	>1024
P-272.1	1	4	>1024	>1024	>1024	0,25	0,5	>1024	>1024	>1024

Tabla 20. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. aureus* (IV).
(Datos expresados en mg/L).

ANTIBIÓTICO	CLOXACILINA					DAPTOMICINA				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
15981	0,25	1	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-1	>32	>32	>1024	1024	>1024	1	2	>1024	>1024	>1024
P-2	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	2	>1024	>1024	>1024
P-4	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	2	>1024	>1024	>1024
P-18	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	1	>1024	>1024	>1024
P-19	0,25	2	>1024	>1024	≤8	1	1	>1024	>1024	>1024
P-41	16	32	>1024	>1024	>1024	0,5	2	>1024	>1024	>1024
P-61T3	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	1	>1024	>1024	>1024
P-61T4	>32	>32	>1024	>1024	>1024	1	2	>1024	>1024	>1024
P-62A	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-68	>32	>32	>1024	>1024	>1024	1	2	>1024	>1024	>1024
P-82.1	>32	>32	>1024	>1024	>1024	1	1	>1024	>1024	>1024
P-95	4	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	1	1024	>1024	>1024
P-104.1	0,25	0,5	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-112	>32	>32	>1024	>1024	>1024	1	4	>1024	>1024	>1024
P-138	0,25	0,25	>1024	>1024	>1024	1	2	>1024	>1024	>1024
P-251	1	1	>1024	>1024	>1024	1	2	>1024	>1024	>1024
P-272.1	0,25	1	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024

Tabla 21. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. aureus* (V).
Datos expresados en mg/L.

ANTIBIÓTICO		FOSFOMICINA				LINEZOLID				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
15981	1	32	>1024	>1024	>1024	1	>32	>1024	>1024	>1024
P-1	1	64	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-2	1	64	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-4	1	32	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-18	1	128	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-19	128	>128	>1024	>1024	>1024	1	>32	>1024	>1024	>1024
P-41	1	64	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-61T3	1	128	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-61T4	1	128	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-62A	1	64	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-68	1	128	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-82.1	1	16	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-95	1	64	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-104.1	1	8	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-112	1	8	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-138	1	64	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-251	16	64	>1024	>1024	>1024	2	32	>1024	>1024	>1024
P-272.1	0,5	16	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024

Tabla 22. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. epidermidis* (I).
Datos expresados en mg/L.

ANTIBIÓTICO	RIFAMPICINA					VANCOMICINA				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
ATCC 35984	0,015	0,06	64	32	64	2	4	>1024	>1024	>1024
P-6.5	0,015	0,12	32	64	64	2	2	1024	>1024	>1024
P-23.2	0,015	0,015	16	>64	32	2	2	>1024	>1024	>1024
P-33.1	0,015	0,03	64	>64	64	2	4	>1024	>1024	>1024
P-53B	0,015	0,06	64	64	64	2	2	>1024	>1024	>1024
P-55	0,004	0,06	≤0,5	1	32	2	2	<8	≤8	≤8
P-61T1	0,015	0,03	16	64	64	2	2	>1024	>1024	>1024
P-61T2	0,015	0,03	16	64	64	1	2	>1024	>1024	>1024
P-74	8	>8	>64	>64	>64	2	2	>1024	>1024	>1024
P-101	0,007	0,03	32	64	64	2	2	>1024	>1024	>1024
P-146G	0,007	0,12	64	32	64	1	4	>1024	>1024	>1024
P-146B	0,007	0,03	64	32	64	2	2	16	>1024	>1024
P-194	0,015	0,12	8	≤0,5	64	1	1	>1024	>1024	>1024
P-223	0,015	0,06	≤0,5	1	1	1	2	64	≤8	16
P-236	0,004	0,5	64	>64	>64	4	8	>1024	≤8	≤8
P-281	0,015	0,03	32	64	64	4	4	>1024	>1024	>1024

Tabla 23. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. epidermidis* (II).
Datos expresados en mg/L.

ANTIBIÓTICO	TIGECICLINA					CLINDAMICINA				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
ATCC 35984	0,12	0,25	512	>1024	256	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-6.5	0,12	>8	256	>1024	512	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-23.2	0,06	>8	64	>1024	16	0,12	8	>1024	>1024	16
P-33.1	0,25	>8	512	>1024	512	0,12	1	>1024	>1024	>1024
P-53B	0,12	2	256	>1024	256	0,12	4	>1024	>1024	>1024
P-55	0,06	8	<8	≤8	≤8	0,25	4	<8	>1024	>1024
P-61T1	0,06	>8	256	>1024	128	0,12	4	>1024	>1024	>1024
P-61T2	0,06	>8	64	1024	256	0,12	8	>1024	>1024	>1024
P-74	0,12	>8	512	>1024	256	0,12	8	>1024	>1024	>1024
P-101	0,06	>8	256	1024	256	0,12	0,5	>1024	>1024	1024
P-146G	0,25	4	128	1024	256	0,25	4	>1024	>1024	>1024
P-146B	0,25	2	512	1024	256	0,25	0,5	>1024	>1024	>1024
P-194	0,5	8	64	>1024	512	0,12	2	>1024	>1024	>1024
P-223	0,06	4	256	16	16	>8	>8	>1024	16	>1024
P-236	0,25	4	512	≤8	≤8	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-281	0,25	>8	128	>1024	64	>8	>8	>1024	>1024	>1024

Tabla 24. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. epidermidis* (III).
Datos expresados en mg/L.

ANTIBIÓTICO	COTRIMOXAZOL					CIPROFLOXACINO				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
ATCC 35984	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,25	0,5	512	16	1024
P-6,5	2	8	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-23,2	2	4	>1024	64	16	0,25	0,5	512	≤8	16
P-33,1	32	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	1	512	>1024	512
P-53B	2	8	>1024	>1024	>1024	1	2	512	>1024	>1024
P-55	4	>32	>1024	>1024	>1024	1	2	≤8	≤8	≤8
P-61T1	4	16	>1024	>1024	16	0,25	0,5	1024	>1024	≤8
P-61T2	2	32	>1024	>1024	>1024	0,25	0,25	>1024	>1024	>1024
P-74	2	8	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024
P-101	2	8	>1024	>1024	>1024	2	8	512	>1024	>1024
P-146G	1	4	>1024	>1024	>1024	0,25	0,25	512	>1024	>1024
P-146B	0,5	4	>1024	>1024	>1024	0,06	1	256	>1024	>1024
P-194	4	16	>1024	>1024	1024	0,25	0,25	512	>1024	>1024
P-223	2	16	16	≤8	512	4	4	≤8	>1024	>1024
P-236	2	>32	>1024	>1024	512	4	8	>1024	>1024	>1024
P-281	>32	>32	>1024	>1024	>1024	>8	>8	>1024	>1024	>1024

Tabla 25. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. epidermidis* (IV).
Datos expresados en mg/L.

ANTIBIÓTICO	CLOXACILINA					DAPTOMICINA				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
ATCC 35984	0,5	0,5	>1024	≤8	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-6.5	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,5	1	>1024	>1024	>1024
P-23.2	0,25	0,25	>1024	≤8	≤8	1	1	>1024	16	≤8
P-33.1	8	32	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-53B	1	1	>1024	16	>1024	0,5	4	>1024	>1024	>1024
P-55	0,25	0,5	≤8	≤8	≤8	0,5	1	≤8	≤8	≤8
P-61T1	0,25	1	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-61T2	0,25	0,5	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	>1024	>1024	>1024
P-74	32	>32	>1024	>1024	>1024	1	1	>1024	>1024	>1024
P-101	1	4	>1024	>1024	>1024	0,5	1	>1024	>1024	>1024
P-146G	0,25	0,5	>1024	>1024	>1024	0,5	1	>1024	>1024	>1024
P-146B	0,12	1	>1024	>1024	>1024	0,5	0,5	16	>1024	>1024
P-194	0,5	1	>1024	128	≤8	0,5	0,5	1024	≤8	≤8
P-223	2	2	≤8	≤8	16	0,25	1	16	≤8	≤8
P-236	0,5	32	>1024	≤8	>1024	0,5	1	>1024	≤8	≤8
P-281	>32	>32	>1024	>1024	>1024	0,25	0,5	>1024	>1024	>1024

Tabla 26. Resultados del estudio de sensibilidad por cepa en *S. epidermidis* (V).
Datos expresados en mg/L.

ANTIBIÓTICO	FOSFOMICINA					LINEZOLID				
CEPA	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E	CMI	CMB	MBEC	MBEC+NAC	MBEC+E
ATCC 35984	1	8	>1024	≤8	>1024	1	>32	>1024	>1024	>1024
P-6.5	4	64	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-23.2	4	64	>1024	16	16	1	32	>1024	>1024	>1024
P-33.1	1	32	>1024	>1024	>1024	1	>32	>1024	>1024	>1024
P-53B	0,25	4	>1024	>1024	>1024	1	32	>1024	>1024	>1024
P-55	0,25	2	512	≤8	≤8	1	32	>1024	>1024	>1024
P-61T1	4	32	>1024	>1024	>1024	1	>32	>1024	>1024	>1024
P-61T2	4	64	>1024	>1024	>1024	1	>32	>1024	>1024	>1024
P-74	1	8	>1024	>1024	>1024	2	>32	>1024	>1024	>1024
P-101	0,25	8	>1024	>1024	>1024	1	32	>1024	>1024	>1024
P-146G	2	8	>1024	>1024	≤8	1	32	1024	>1024	>1024
P-146B	0,5	8	>1024	>1024	>1024	1	32	>1024	>1024	>1024
P-194	0,5	4	>1024	≤8	≤8	1	32	1024	>1024	>1024
P-223	2	4	≤8	≤8	≤8	0,5	>32	1024	>1024	>1024
P-236	2	64	256	≤8	256	1	>32	>1024	32	16
P-281	1	8	>1024	>1024	1024	1	32	>1024	>1024	>1024

4.4. ENSAYO CON PÉPTIDO INHIBIDOR DEL *QUORUM SENSING*

El efecto del péptido *RIP* (YSPWTNF-NH₂) sobre la formación de biopelículas se analizó con las cepas *S. aureus* 15981, *S. epidermidis* ATCC 35984, P-4 (*S. aureus*) Y P-33.1 (*S. epidermidis*) mediante las técnicas de MtP y de Stepanovic.

Los resultados obtenidos no mostraron una diferencia significativa en cuanto a la formación de biopelícula con la adición del péptido *RIP* o sin ella, por lo que aparentemente éste no afecta a la formación de dichas biopelículas en las cepas analizadas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Resultados obtenidos en los ensayos con el péptido *RIP*.

CEPA	MtP (540 nm)							
	- <i>RIP</i>				+ <i>RIP</i>			
	D.O.(1)	D.O.(2)	D.O.(3)	MEDIA	D.O.(1)	D.O.(2)	D.O.(3)	MEDIA
15981	0,126	0,096	0,123	0,115	0,098	0,098	0,104	0,1
P.4	0,075	0,066	0,068	0,07	0,075	0,066	0,073	0,071
ATCC 35984	0,093	0,113	0,106	0,104	0,154	0,127	0,114	0,132
P.33.1	0,156	0,135	0,126	0,139	0,14	0,153	0,138	0,144
CONTROL -	0,063	0,059	0,061	0,061				
CEPA	STEPANOVIC (570 nm)							
	- <i>RIP</i>				+ <i>RIP</i>			
	D.O.(1)	D.O.(2)	D.O.(3)	MEDIA	D.O.(1)	D.O.(2)	D.O.(3)	MEDIA
15981	0,158	0,238	0,215	0,204	0,16	0,132	0,159	0,15
P.4	0,119	0,093	0,106	0,106	0,09	0,106	0,117	0,104
ATCC 35984	0,238	0,255	0,239	0,244	0,29	0,268	0,24	0,266
P.33.1	0,392	0,576	0,676	0,548	0,628	0,608	0,635	0,624
CONTROL -	0,076	0,073	0,084	0,078				

4.5. BIOCERÁMICAS MESOPOROSAS COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

4.5.1. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE ANTIBIÓTICO LIBERADO

En todos los casos se observó que la mayor liberación del antibiótico se produjo en los momentos iniciales del experimento. En los experimentos con los antibióticos liberados de manera individual se observó una liberación de 30 mg/L para el linezolid, seguido por la vancomicina, con 7,1 mg/L a las 24 horas. En el caso de los experimentos individuales con rifampicina no se obtuvieron resultados concluyentes, probablemente debido a su particular solubilidad.

A continuación se muestran las gráficas de liberación para vancomicina y linezolid.

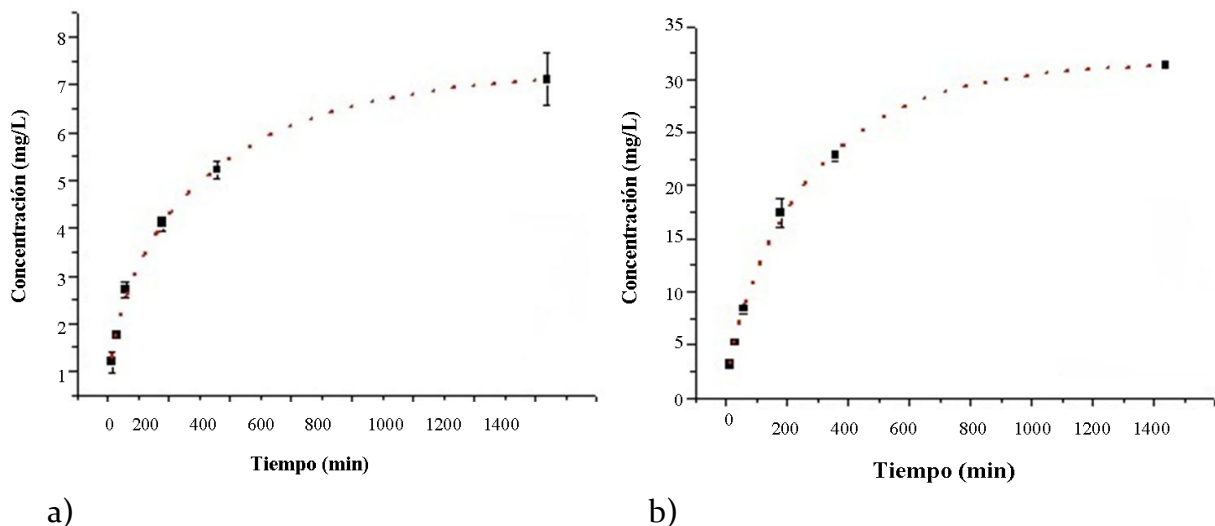


Figura 12. Gráficas de liberación individual de vancomicina (a) y linezolid (b).

Curiosamente, en el caso de las combinaciones de los distintos antibióticos (figura 13) se observó que la cantidad liberada fue ligeramente superior a los experimentos de liberación individual, tanto en las combinaciones dos a dos como en la combinación de los tres antibióticos de manera conjunta. En el caso de la rifampicina, la liberación a las 24 horas fue de 89,6 mg/L, para la vancomicina de 10,9 mg/L, y para el linezolid de 34,5 mg/L. Todos estos resultados pueden observarse en la tabla 28.

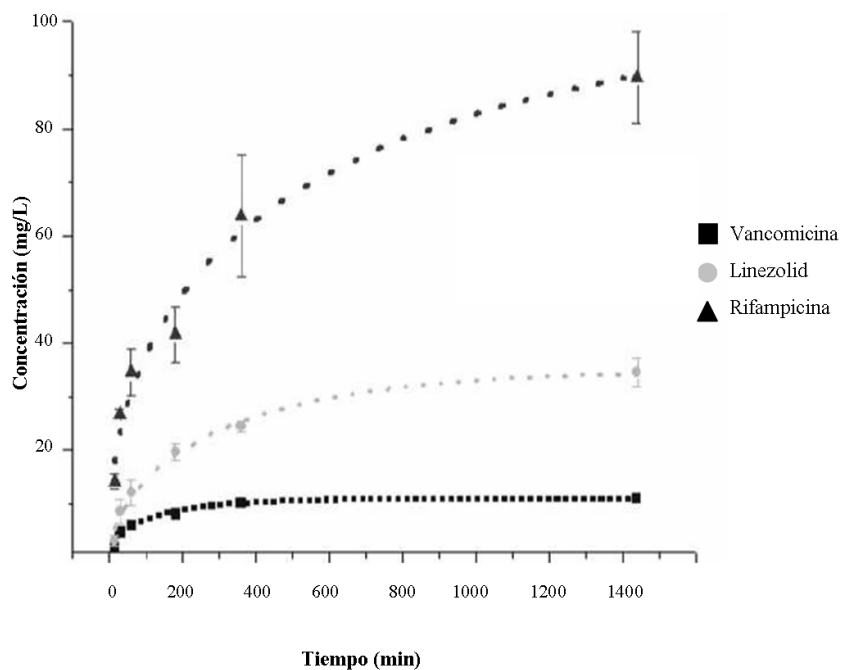


Figura 13. Gráfica de liberación conjunta de los tres antibióticos.

4.5.2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANTIBIÓTICO LIBERADO

La medición de dicha actividad permitió detectar qué antibiótico se mantiene más activo tras el proceso de carga y liberación en las piezas de SBA-15. El antibiótico que perdió un menor grado de actividad en este estudio fue la rifampicina, con una concentración activa equivalente a 96,14 mg/L a las 24 horas, seguido por el linezolid, con 7,2 mg/L de concentración activa y por último la vancomicina, con 5,5 mg/L.

La obtención de los datos de actividad biológica en las combinaciones de antibiótico no fue posible debido a la imposibilidad de distinguir cada efecto de manera individual. Todos los resultados se muestran con detalle en la tabla 28.

Según todos estos resultados y teniendo en cuenta todas las mediciones, el antibiótico que de manera global mantuvo una mayor actividad fue la rifampicina, seguida por la vancomicina, con 7,1 mg/l de liberación y 5,5 mg/L de actividad (77,46% de actividad), y por último el linezolid, con una liberación de 30 mg/L y una concentración activa de 7,2 mg/L.

Tabla 28. Resultados globales del estudio de liberación de antibióticos.

TIEMPO	CONCENTRACIÓN ACTIVA (mg/L)			CONCENTRACIÓN MEDIA LIBERADA (mg/L)			CONCENTRACIÓN MEDIA LIBERADA (mg/L)		CONCENTRACIÓN MEDIA LIBERADA (mg/L)		CONCENTRACIÓN MEDIA LIBERADA (mg/L)		CONCENTRACIÓN MEDIA LIBERADA (mg/L)		
	Experimentos individuales			Experimentos de liberación individual			Van + Lin		Van + Rif		Lin + Rif		Van+ Lin + Rif		
	Van	Lin	Rif	Van	Lin	Rif	Van	Lin	Van	Rif	Lin	Rif	Van	Lin	Rif
15 min	0	0	8,47	1,2	3,1	8,6	2,3	7,3	1,5	10,3	1,4	17,2	2	3,1	14,4
30 min	1,51	0	13,32	1,7	5,2	15,4	4,5	13,7	2,6	24,2	3,9	33,1	4,7	8,5	26,8
60 min	2,04	5	25,83	2,7	8,4		6,1	20,4	2,9	30	5,2	33	5,9	12,1	34,5
3 h	4,17	5,44	53,91	4,1	17,4	23	9,3	27,5	5,4	46,2	6,6	18,2	8,1	19,7	41,6
6 h	5,5	7,2	60,55	5,2	22,8	44,4	9,8	33,8	6,9	66,8	11	28,8	10,1	24,4	63,7
24 h	5,5	7,2	96,14	7,1	30	52,2	11,1	39,6	8,2	89,9	15,4	31,1	10,9	34,5	89,6

*Van: Vancomicina; Lin: Linezolid; Rif: Rifampicina.

5. DISCUSIÓN

El empleo de biomateriales en la medicina moderna ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años, puesto que estos compuestos se han desarrollado hasta ser empleados en numerosas prácticas médico-quirúrgicas, desde la colocación de catéteres intravenosos o sondas urinarias hasta el desarrollo de complejas prótesis osteoarticulares o cardíacas. Uno de los principales problemas que existen en el momento actual en relación con el empleo de estos biomateriales es la aparición de infecciones asociadas a los mismos, en concreto, las infecciones asociadas a implantes suponen un importante problema en cirugía ortopédica, siendo la complicación más grave en este campo.

La profilaxis antimicrobiana, el diseño de los implantes, las mejoras en las técnicas quirúrgicas y el flujo laminar en los quirófanos han disminuido considerablemente las tasas de infección ortoprotésica, sin embargo, debido al aumento en el número de cirugías de implantación que se realizan, es de esperar que el número de casos aumente de manera paralela en los próximos años (10, 129).

Tanto el diagnóstico como el tratamiento presentan una serie de dificultades, a menudo relacionadas con la patogenia, que frecuentemente va asociada a la formación de una biopelícula sobre el implante, en la mayoría de los casos por *S. aureus* y *S. epidermidis* (20). Entender el concepto de biopelícula es esencial a la hora de prevenir, diagnosticar y tratar las infecciones asociadas a la formación de estas estructuras. Estas comunidades microbianas presentan una serie de características que dificultan el manejo de dichas infecciones, como su mayor resistencia a los agentes antimicrobianos, al sistema inmune y la dificultad de aislar los microorganismos mediante métodos convencionales (19, 73).

Por este motivo, los métodos de diagnóstico habituales y los tratamientos antibióticos sistémicos a menudo no resuelven por completo el caso, demostrando la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y nuevas aproximaciones en el tratamiento con el fin de mejorar el abordaje y la curación de los pacientes aquejados de estas infecciones. Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas basadas en el empleo de la sonicación para mejorar la detección de patógenos en estas infecciones (36, 38). Sin embargo, a pesar de esos avances, recientemente se ha demostrado que existen organismos en dichas biopelículas no detectables mediante las técnicas microbiológicas convencionales, por lo que será necesario en un futuro desarrollar nuevas herramientas diagnósticas que permitan la detección de los mismos (9).

La combinación de criterios clínicos, pruebas de imagen, histopatología y cultivo microbiológico es la metodología que suele emplearse para el diagnóstico, siendo el diagnóstico etiológico es el más determinante, ya que es el que permite aplicar un tratamiento antibiótico dirigido. Sin dicho diagnóstico, el tratamiento debe ser empírico, con lo que el riesgo de tratamiento fallido aumenta considerablemente. A pesar de que el empleo de dichas técnicas consigue identificar muchos casos, hoy en día muchos pacientes aún quedan sin diagnosticar debido a las limitaciones de dichas técnicas.

Para intentar solventar dichas dificultades se han propuesto diversos métodos basados principalmente en técnicas de biología molecular (44, 130-134). El diagnóstico molecular se basa en la detección y en ocasiones la cuantificación de macromoléculas como el ADN, ARN o proteínas específicas del patógeno. La utilización de técnicas de biología molecular para establecer la causa de las enfermedades infecciosas es cada vez más frecuente en los laboratorios de microbiología clínica, por lo que resultan de un gran interés en el diagnóstico de infecciones asociadas a implantes protésicos (44, 135).

La mayoría de los estudios sobre el uso de herramientas de biología molecular para la detección de bacterias en tejido periprotésico se han basado en la amplificación de regiones bacterianas de amplio rango, como las secuencias del ARNr 16S y la consiguiente identificación del microorganismo detectado mediante secuenciación del fragmento. Más recientemente también se ha evaluado el uso de cebadores específicos para determinados patógenos (37).

Además de las técnicas de PCR o FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), algunos autores han demostrado con éxito que la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es de utilidad en el diagnóstico de las infecciones causadas por *S. aureus* y *S. epidermidis* mediante la detección del epítipo SSPA, que únicamente se expresa cuando estos microorganismos se encuentran formando una biopelícula (9, 136). En general, la utilización de anticuerpos anti-biopelícula podría ser otra alternativa a la hora de detectar estas infecciones.

Otra estrategia es aquella basada en el uso de kits comerciales, los cuales deben ser modificados para su utilización en infecciones asociadas a implantes por sus requerimientos en cuanto a sonicación de la muestra. Los test comerciales están diseñados y estandarizados para su utilización en la rutina diaria de diferentes laboratorios. En el presente estudio se ha utilizado el kit comercial *GenoType BC* (Hain Lifescience, Alemania), específico para patógenos en muestras de sangre. Para ello se utilizó un método similar al descrito por Achermann y col. (34) para la identificación de bacterias en implantes sonicados. Este kit está basado en la amplificación por PCR del gen ARNr 16S, y la posterior hibridación en unas tiras de nitrocelulosa que contienen una serie de sondas para cada posible microorganismo a identificar. Las combinaciones

de sondas hibridadas permiten la identificación del microorganismo en cuestión, e incluso la detección de la presencia de más de una especie en la muestra.

En este estudio se incluyeron tanto muestras de prótesis osteoarticulares como de material de osteosíntesis utilizado en el tratamiento de fracturas, este último no evaluado mediante técnicas moleculares hasta el momento. Se observó que la detección mediante técnicas moleculares incrementó el número de muestras positivas encontradas en los implantes protésicos, de acuerdo a los resultados publicados por otros autores (34, 44).

Respecto a las muestras de pacientes que habían recibido un tratamiento antibiótico previo a la intervención, no se encontraron diferencias significativas en los resultados entre aquellos que habían recibido un tratamiento y aquellos que no, a diferencia de los estudios previos (34). La ausencia de diferencias entre ambos grupos también se observó en el número de colonias en las muestras positivas mediante un protocolo de cultivo cuantitativo. Además, se detectó un número bajo de contaminantes potenciales. Algunos autores defienden que el uso de bolsas para la sonicación puede estar asociado con la aparición de un número elevado de contaminaciones (40). Por el contrario, en este estudio el número de contaminantes resultó ser razonablemente bajo, y muchos de ellos aislados a partir de muestras de pacientes no diagnosticados de infección, y con recuentos bajos, por lo que su importancia clínica es cuanto menos dudosa. El protocolo seguido incluyó un recambio del agua destilada para cada ronda de sonicación y la revisión de las bolsas antes y después del proceso. El uso de estas bolsas permite la manipulación en condiciones estériles, particularmente en el caso de los implantes de gran tamaño, cuya manipulación resultaría difícil en recipientes rígidos. Aun así, la interpretación de los aislamientos debe hacerse con cautela, ya que algunos

microorganismos poco comunes se han descrito como causa de algunas infecciones asociadas a implantes, por lo que su aparición no debe catalogarse automáticamente como contaminación.

El principal interés de este estudio radica en la evaluación de una técnica de biología molecular combinada con un protocolo de sonicación para el diagnóstico de los pacientes. En este sentido, el kit utilizado detectó el 71,6% de las muestras procedentes de pacientes con diagnóstico de infección, mientras que el cultivo sólo detectó el 61,5%, demostrando que la técnica tiene una mayor sensibilidad a la hora de detectar las infecciones asociadas a implante.

La detección molecular de patógenos en pacientes sin diagnóstico clínico de infección sigue constituyendo un desafío respecto a la interpretación de los resultados. Algunos autores contemplan la posibilidad de que estos casos se traten en realidad de infecciones subclínicas o consideradas erróneamente aflojamientos asépticos (137) . En este trabajo, el número de resultados positivos se incrementó en estos pacientes con respecto a aquellos con diagnóstico clínico inicial. Otros autores han considerado este tipo de resultados como posibles contaminaciones y han realizado modificaciones en la técnica, disminuyendo la sensibilidad a niveles similares al cultivo convencional (138). Estos resultados por lo tanto podrían deberse a infecciones subclínicas, contaminaciones o limitaciones en la técnica.

Por todo ello, la interpretación de los resultados obtenidos en el presente estudio en ese sentido debe hacerse con cautela, especialmente cuando se detectan patógenos como *S. pyogenes* o *S. aureus*. La reducción de la sensibilidad no es un buen enfoque, ya que da

lugar a la pérdida de la principal ventaja de dichas técnicas, que es el incremento de la sensibilidad.

Si se analizan los datos obtenidos en pacientes con material de osteosíntesis, los resultados obtenidos son diferentes a aquellos de pacientes con implantes protésicos. En estos casos, no se ha detectado una mejora significativa en el diagnóstico, probablemente debido a la distinta patogenia entre ambos grupos. La aparición de numerosas infecciones polimicrobianas, incluyendo anaerobios en algunos casos (no detectados por el kit) puede ser el motivo de dichos resultados.

A pesar del incremento en la sensibilidad en las muestras protésicas, esta técnica presenta una serie de limitaciones. Ciertos microorganismos, como *S. lugdunensis*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Enterococcus* o todos aquellos microorganismos eucariotas, no son detectables mediante esta técnica. La presencia de más de un microorganismo en la muestra también puede suponer una disminución en la especificidad, y por último, como en todas aquellas pruebas que conllevan la amplificación del gen ARN 16s, pueden aparecer falsos positivos.

El principal problema que plantean las técnicas moleculares es la falta de estandarización, por lo que su utilización en la práctica clínica es problemática.

Por otra parte, las infecciones polimicrobianas también son frecuentes (20, 37, 139). En el presente estudio, alrededor del 22% de las muestras se catalogaron como polimicrobianas. La aplicación de los métodos microbiológicos de detección no sólo ha aumentado la probabilidad de detectar una infección, sino que también la de identificar qué microorganismos son los causantes. Las técnicas convencionales se centran en el aislamiento del microorganismo desde las fuentes de infección después de la

inoculación de las muestras en diferentes medios de cultivo (14, 20, 32, 96). A pesar de ser esta la técnica estándar para el diagnóstico, pueden aparecer diversos problemas que afecten al resultado final, como la incorrecta toma y/o manipulación de las muestras, aparición de contaminaciones, número insuficiente de microorganismos viables aislados, presencia de biopelículas y presencia de microorganismos exigentes que no crecen en los medios de cultivo utilizados y dan lugar a alrededor de un 20% de falsos negativos (15), incluso aunque se incluyan nuevos métodos basados en biopelículas (34, 36-38, 44).

Observando las dificultades existentes en el diagnóstico de estas infecciones, la ampliación del conocimiento sobre las biopelículas implicadas en este tipo de infecciones es esencial, ya que ayudará a mejorar los métodos de diagnóstico y los esquemas de tratamiento. La detección de la capacidad formadora de biopelículas en los microorganismos causantes de una infección será de una gran importancia de cara a establecer un tratamiento más preciso en cada caso. A pesar de ello, aún existen pocos estudios que evalúen la capacidad de dichas cepas para formar biopelícula *in vitro*.

En el presente estudio se utilizaron distintos métodos para determinar la capacidad formadora de biopelícula en cepas aisladas de muestras de pacientes con infección asociada a un implante ortopédico, incluyendo muestras protésicas y material de osteosíntesis. Observando los resultados obtenidos queda demostrada la necesidad de recurrir a diversos tipos de técnicas, tanto genotípicas como fenotípicas para la completa detección del potencial para formar una biopelícula en las cepas estudiadas.

Entre las técnicas empleadas, el test MtP, inicialmente descrito por Christensen y col. (122) es una de las más utilizadas. Esta técnica está basada en la capacidad de la

biopelícula para retener el colorante Cristal Violeta y la posterior medición por espectrometría tras el lavado y decoloración con etanol, y resulta bastante útil para determinar la adhesión de las bacterias a la superficie de forma indirecta. No permite una detección directa de la formación del polisacárido, pero si permite cuantificar de forma aproximada la magnitud y espesor de la capa bacteriana formada en el fondo del pocillo, permitiendo la detección de la capacidad de una determinada cepa para constituir una biopelícula. Las medidas de D.O. ofrecen una información útil de la capacidad de las cepas bacterianas para crecer rápidamente adhiriéndose al sustrato (Arciola CR et al, 2006). La utilidad de esta técnica ha sido evaluada con distintos microorganismos y resulta muy popular debido a la sencillez de realización. El método de Stepanovic es otra técnica similar, aunque más estandarizada que MtP. En las cepas aquí estudiadas se encontraron discrepancias entre ambas técnicas. La más notoria es el resultado obtenido para la cepa de *S. aureus* P-95, con el dato más alto en la técnica de MtP y negativa para la formación de biopelícula mediante la técnica de Stepanovic. Esta cepa en particular mostró una tasa de crecimiento algo más lento que el resto, y también dio un resultado negativo en CLSM. La modificación que se empleó para el método de MtP fue la prolongación del tiempo de incubación, lo cual podría ser una explicación para esta discrepancia debido a que el desarrollo de la biopelícula en esta cepa requiere más tiempo. Este hecho es importante, ya que se ha comprobado que ciertas cepas de *S. aureus* implicadas en infecciones osteoarticulares crecen más lentamente, como las SVC (79), y la detección de la biopelícula en ellas probablemente requiere más tiempo que para las cepas comunes.

La visualización por microscopía confocal es una técnica de referencia en el estudio de biopelículas (62, 123). Esta técnica permite la visualización directa de la estructura de la biopelícula mediante tinciones fluorescentes como la tinción *LiveDead Backlight*,

utilizada en este estudio. También permite detectar la viabilidad de las bacterias presentes en la biopelícula, así como detectar las zonas donde se produce una multiplicación más activa de las mismas (140). A pesar de ello, no existen estudios relativos a su utilidad como técnica de cribado en un amplio número de cepas clínicas de estafilococo. En este estudio la utilización de la técnica de CLSM únicamente permitió la detección del 54,9% de las cepas analizadas, porcentaje inferior al de las dos técnicas colorimétricas empleadas (93,8% para la técnica de Stepanovic y 68,75% para MtP). A pesar de ello, teniendo en cuenta los resultados por especies, por CLSM se detectaron más casos en *S. epidermidis* que mediante la técnica de Christensen. Este hecho puede deberse a que el material de fabricación de los discos Thermanox[®] permite una mayor adherencia de esta especie que de *S. aureus*, corroborando una vez más la teoría de que *S. epidermidis* se adhiere *in vitro* en mayor medida a polímeros que *S. aureus*.

A pesar de que el porcentaje global de bacterias formadoras de biopelícula detectadas no fue muy elevado, esta técnica permite diferenciar la proporción de bacterias vivas y muertas, por lo que es de utilidad para estudiar diversos aspectos en la biopelícula, siendo importante la elección de la superficie sobre la que se formará la biopelícula para su observación como se ha podido comprobar.

Por último, la técnica de PCR para la detección de los genes del operón *ica* posee una gran importancia, puesto que son genes con una elevada implicación en la formación de la biopelícula en estafilococos. La expresión conjunta de *ica A* e *ica D* da lugar a un incremento significativo en la actividad del enzima acetilglucosaminiltransferasa y a la expresión fenotípica completa del polisacárido (86), todo ello regulado por *ica R*.

La detección de los genes *ica* fue positiva en el 65,6% de las cepas, 6 de ellas con presencia de los tres genes analizados. Teniendo en cuenta que *ica R* es un represor, teóricamente en estas cepas no debería formarse la biopelícula, pero como se ha podido comprobar, todas ellas son positivas al menos para una de las otras técnicas realizadas. Este hecho puede deberse a la compleja regulación a la que está sometida la formación del exopolisacárido o a la posibilidad de que existan otros mecanismos de regulación del operón *ica* independientes de *ica R*, hecho que es defendido por algunos autores (87). Por otra parte, también se pudo observar cómo en las 10 cepas en las que no se detectó la presencia de los genes *ica* analizados se observó resultado positivo en al menos una de las pruebas fenotípicas. Esto indica que la ausencia de los genes *ica* no excluye a las cepas de la formación fenotípica de la biopelícula, existiendo mecanismos alternativos e independientes de *ica* que permiten a estas bacterias su formación. Este hecho ha sido ampliamente demostrado en la bibliografía (141-144).

Otra observación a tener en cuenta es la mayor presencia de estos genes en las cepas de *S. aureus* que en las de la especie *S. epidermidis* estudiadas. Este hecho podría deberse a la posibilidad de que el sistema *ica* sea predominante en *S. aureus*, mientras que en *S. epidermidis* los mecanismos alternativos sean más frecuentes.

Otros factores ya identificados que están implicados en la formación de biopelículas y están relacionados con el operón *ica* en este tipo de microorganismos son, por ejemplo, el factor σ^B , activador de la expresión de los genes *ica* bajo condiciones estresantes (84), Sar A, regulador positivo de la transcripción de dicho locus en *S. aureus* y *S. epidermidis*; *rbf*, etc.(145).

Con respecto a la adhesión concreta a prótesis, en estos dos tipos de microorganismos se ha observado la implicación de otros genes y proteínas, como *fnb A* y *fnb B* (proteínas de unión a fibronectina) (146) o *cna* (adhesión a colágeno) (147), entre otras moléculas.

Teniendo en cuenta todas las pruebas realizadas, se consideró que todas las cepas estudiadas poseen la capacidad de formar un biopelícula, ya que en todas ellas se pudo comprobar este hecho al menos por una de las técnicas.

Todos los resultados demuestran la necesidad de aplicar un enfoque que combine tanto técnicas moleculares como fenotípicas para la evaluación óptima de la capacidad formadora de biopelícula en cepas clínicas de *Staphylococcus* sp. aisladas de infecciones asociadas a implantes protésicos.

Tanto las mejoras en el diagnóstico de las infecciones asociadas a implantes como el mayor conocimiento de las biopelículas causantes son de vital importancia para un mejor enfoque en el tratamiento.

El tratamiento antimicrobiano de las infecciones asociadas a implantes causadas por *S. aureus* y *S. epidermidis* aún sigue planteando un reto debido al comportamiento variable de estos microorganismos frente a los distintos antibióticos. Además, la eficacia tanto del diagnóstico como del tratamiento puede verse dificultada por la presencia de cepas multirresistentes o de las mencionadas SCV en *S. aureus* (79, 148, 149). Estas últimas pueden permanecer sin diagnosticar si los tiempos de incubación no son los apropiados, por lo que se recomienda alargar estos tiempos en pacientes con síntomas clínicos de infección (150, 151). En este sentido, se realizó un estudio de sensibilidad frente a distintos antibióticos de uso habitual en las mismas cepas anteriormente mencionadas, tanto en su estado planctónico, como formando una biopelícula.

Entre las cepas estudiadas se detectó un alto porcentaje de SAMR (66,67%) que coincide con la elevada prevalencia de estas cepas previamente documentada (152, 153). Por otra parte, todas las cepas SAMR analizadas presentaron el mismo patrón de resistencia, que es el más comúnmente observado en España (154). Este hecho sugiere que la disponibilidad de antimicrobianos activos frente a SAMR se ha visto drásticamente reducida. Del mismo modo, también se encontraron numerosas cepas de *S. epidermidis* no sensibles a cloxacilina entre las cepas estudiadas (62,5%).

Vancomicina ha sido tradicionalmente el agente antimicrobiano de elección frente a las infecciones asociadas a implantes ortopédicos causadas por cepas de estafilococos multirresistentes. No obstante, debido a un incremento reciente en los valores de CMI y a la detección de cepas intermedias y resistentes a este antibiótico detectadas en ambas especies la utilización de este compuesto debe realizarse con precaución (155-161). Entre las cepas estudiadas se encontró una cepa de *S. aureus* con susceptibilidad intermedia a vancomicina (P-251). Además, la actividad bactericida de dicho antibiótico fue mayor para *S. epidermidis* que para *S. aureus* (94,74 frente a 55,56%), constituyendo otra desventaja adicional para su utilización en este contexto. Debido a dichas razones se han propuesto otros antibióticos alternativos a vancomicina.

Rifampicina, un antibiótico con una gran eficacia frente a estas infecciones demostró tener una muy buena actividad *in vitro* frente a las cepas de ambas especies estudiadas. A pesar de ello, este compuesto actúa como bacteriostático en la mayoría de los casos, mostrando la necesidad de combinarlo con otros compuestos, como β -lactámicos, glucopéptidos, fluoroquinolonas o cotrimoxazol, para evitar el desarrollo de resistencias (103, 162). Tigeciclina, daptomicina, fosfomicina y linezolid pueden ser buenas alternativas como terapia antimicrobiana.

Los resultados obtenidos muestran que tigeciclina y linezolid poseen una extraordinaria actividad frente a todas las cepas, con una susceptibilidad del 100%. Sin embargo, al igual que ocurre con rifampicina, la actividad de linezolid es bacteriostática en todos los casos, mientras que tigeciclina se comporta como bactericida únicamente para ciertos *S. aureus*.

Daptomicina, se ha postulado como una alternativa viable a vancomicina debido a su alto nivel de actividad antimicrobiana y según se ha demostrado previamente, también frente a biopelículas (163, 164) . Según los datos obtenidos, este compuesto inhibió a todas las cepas, actuando como bactericida en la mayoría de los casos y en ambas especies (77.78% para *S. aureus* y 78.95% para *S. epidermidis*), coincidiendo con los datos previamente publicados (165). Sin embargo, su administración por vía parenteral sólo hace posible su utilización en pacientes hospitalizados. Por ello son necesarias otras alternativas con disponibilidad oral para el tratamiento de pacientes fuera del ámbito hospitalario (106). Fosfomicina también dio lugar a buenos resultados, y únicamente una cepa de la especie *S. aureus* mostró ser resistente a este antimicrobiano, aunque se plantea la misma problemática de actividad bacteriostática.

En cuanto al resto de antibióticos, los resultados de actividad antimicrobiana en general fueron muy variables entre ambas especies. Cotrimoxazol y clindamicina mostraron mejor actividad frente a *S. aureus* que frente a *S. epidermidis*. De hecho, todas las cepas SAMR estudiadas resultaron ser susceptibles a cotrimoxazol, hecho que corrobora los datos obtenidos en estudios previos por otros autores (113). Ambos antibióticos pueden administrarse por vía oral, incrementando su utilidad en el manejo de algunos pacientes.

En definitiva, las cepas de SARM son una causa cada vez más frecuente de infecciones asociadas a implantes ortopédicos y, en consecuencia, es necesario el uso de antibióticos más eficaces. De acuerdo con nuestros datos, rifampicina, tigeciclina, daptomicina, fosfomicina y linezolid mostraron una alta actividad *in vitro* frente a la mayoría de las cepas de estafilococos estudiadas.

Sin embargo, los resultados de los estudios de sensibilidad convencionales pueden no correlacionarse con el efecto de los antibióticos sobre la biopelícula bacteriana, por lo que tras realizar el estudio de susceptibilidad en las bacterias en estado planctónico determinando la CMI y CMB para cada antibiótico, se realizó el estudio de sensibilidad en biopelículas. Para ello se utilizó el método de Calgary o CBD y se comprobó la correcta formación de las biopelículas por microscopía de fluorescencia. Esta técnica ha sido utilizada en multitud de estudios (166-168), y a pesar de no existir un método estandarizado para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana en biopelículas, este método parece el más adecuado, ya que permite la formación de biopelículas equivalentes y es altamente reproducible.

Los resultados demostraron que ninguno de los antibióticos seleccionados fue totalmente efectivo en cuanto a la erradicación de las biopelículas a las 24 horas, con datos de CMEB muy superiores a los de CMI (>1024 mg/L en la mayoría de los casos), a pesar de que la eficacia de muchos de estos compuestos frente a biopelículas ha sido comprobada en otros estudios utilizando diferentes metodologías (169-171), confirmando el hecho de que la concentración necesaria de antibiótico para erradicar las biopelículas puede ser desde 100 hasta 1000 veces superiores a la CMI.

Rifampicina y tigeciclina son los dos antibióticos que mostraron una mejor actividad en los ensayos realizados frente a biopelículas. En el caso de la rifampicina estos resultados se correlacionan con los datos previamente publicados basados en estudios clínicos (172, 173). Los datos obtenidos fueron ligeramente inferiores en las cepas de la especie *S. epidermidis*, aunque los datos de CMBE para ambos compuestos son bastante elevados. De especial interés son los resultados obtenidos para dos cepas de dicha especie, cuyas biopelículas parecen verse afectadas por la mayoría de los antibióticos utilizados para el estudio. Por ello podría decirse que las biopelículas formadas por las cepas de la especie *S. epidermidis* parecen ser menos resistentes a dichos antibióticos que las de *S. aureus*.

Para complementar el estudio de sensibilidad a antimicrobianos en biopelículas, se quiso analizar además el efecto de la combinación de NAC y de eritromicina a concentración subinhibitoria con los antibióticos de estudio.

NAC es un compuesto antimucolítico de sobra conocido que podría actuar sobre el polisacárido de la matriz de la biopelícula, aunque por sí solo no posee actividad bactericida. Diversos estudios con varios microorganismos defienden su capacidad para romper los puentes disulfuro que unen las proteínas que forman parte de dicha matriz, por lo que podría desestabilizar la estructura (174, 175). En el presente estudio quiso observarse si existía algún efecto sinérgico al combinarlo con los distintos antimicrobianos.

Por otra parte, también se quiso comprobar si existía algún efecto al combinar esos mismos antimicrobianos con eritromicina a concentración subinhibitoria. Existen estudios previos realizados con otros macrólidos, principalmente en *P. aeruginosa*, en

los cuales se demuestra su capacidad para actuar frente a la biopelícula (176, 177); pero no existen por el momento estudios realizados con macrólidos a concentración subinhibitoria en estafilococos.

En cuanto a los resultados, en las cepas de la especie *S. aureus* los datos obtenidos fueron muy homogéneos y no se apreció ninguna variación en el resultado de MBEC al añadir NAC o eritromicina a las concentraciones seleccionadas para el estudio a pesar de que en el caso de NAC diversos estudios han demostrado su efectividad al combinarse con rifampicina (178), ciprofloxacino (179), tigeciclina (180) y linezolid (181). De hecho, en este estudio la combinación entre tigeciclina y NAC incluso aumentó el valor de MBEC en varias cepas. En el caso de *S. epidermidis*, los resultados fueron cepa-dependientes, por lo que por el momento no es posible alcanzar una conclusión clara sobre el efecto de estas combinaciones. En las cepas de esta especie la combinación entre rifampicina y tigeciclina con NAC aumentó la CMEB, por el contrario, este dato disminuyó levemente al combinar este compuesto con cotrimoxazol, ciprofloxacino, cloxacilina, daptomicina y fosfomicina. En las combinaciones de antibióticos con eritromicina a concentración subinhibitoria, estas sólo fueron satisfactorias en unos pocos casos, y no parece existir una correlación entre resistencia a eritromicina y los resultados de las combinaciones. Únicamente una cepa vio disminuida su susceptibilidad en la biopelícula combinando ambos compuestos con la mayoría de los antibióticos analizados. Este hecho por el momento carece de explicación.

En general, la principal limitación de dichos estudios de susceptibilidad en biopelículas está relacionada con el tiempo de incubación en presencia del antibiótico, ya que en la práctica clínica se recomiendan tratamientos prolongados junto con la retirada del

implante (20), por lo que probablemente son necesarios más estudios para evaluar la resistencia de la biopelícula a los antimicrobianos con periodos de incubación más largos.

La resistencia a antimicrobianos demostrada por las biopelículas debe ser tomada en cuenta en el manejo de los pacientes con infección asociada a implante, y en general, en todas aquellas infecciones en las que haya una biopelícula implicada. Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de buscar nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas y antibiopelícula, así como el desarrollo de nuevas estrategias que ayuden a prevenir y tratar estas infecciones.

Otros antimicrobianos, como dalbavancina (182) o los derivados de rifamicinas (183) podrían ser posibles alternativas al tratamiento de estas infecciones. Recientemente se han desarrollado nuevos antibióticos, como por ejemplo CBR-2092, compuesto híbrido entre rifampicina y quinolona, que podría administrarse en monoterapia, evitando la problemática de las rifamicinas y la necesidad de recurrir a combinaciones de compuestos (184) o Iclaprim, una diaminopirimidina con una potente actividad bactericida *in vitro* frente a SAMR, aunque por el momento su actividad en infecciones protésicas no ha sido demostrada (185).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que ciertas moléculas pueden bloquear la formación de una biopelícula actuando como inhibidores del QS (QSI) (70). Los QSI se plantean como una posible alternativa al tratamiento antibiótico tradicional para las infecciones causadas por biopelículas siempre y cuando no presenten efectos tóxicos. Curiosamente, se ha observado que ciertos antibióticos como el ciprofloxacino o ceftazidime actúan como QSI en *P. aeruginosa* a concentraciones inferiores a la CMI

(186) . Algunos ejemplos de QSI naturales son el ginseng y los extractos derivados del ajo (187-189). En el caso concreto de *Staphylococcus* sp., existen diversos estudios que proponen el péptido inhibidor de la Ribonucleasa III o “*RIP*” como inhibidor de las señales que controlan la formación de biopelícula en estos microorganismos (95).

Por este motivo, en este trabajo se estudió la capacidad del péptido *RIP*, como inhibidor de la formación de biopelícula en 4 cepas de estafilococo seleccionadas por su capacidad de formar una abundante biopelícula *in vitro*. Desafortunadamente, los resultados obtenidos no fueron los esperados, y no se encontraron diferencias significativas en la formación de biopelícula por parte de ninguna de las cepas con o sin la adición del péptido a una concentración de 1 mg/mL. Por ello es necesaria la búsqueda de otros inhibidores del *QS* que actúen sobre otras dianas en la biopelícula de *Staphylococcus* (25, 190).

El compuesto antibiopelículas ideal sería aquel que inactivase algún factor o molécula presente en todas las biopelículas de estafilococo, aunque por el momento no existe esa posibilidad, debido a que la formación de biopelículas es multifactorial (63). Aún así, existe la posibilidad de buscar un factor común que esté presente en un elevado número de ellas, como por ejemplo PIA. Curiosamente, ciertas bacterias producen un enzima capaz de degradar este polisacárido, llamado dispersina B, postulándose como posible compuesto antibiopelícula (191). Otro compuesto con posibilidades en este sentido es la lisostafina, enzima capaz de degradar el peptidoglicano de la pared bacteriana y disgregar el polisacárido extracelular de la biopelícula estafilocócica (192). En los últimos años se ha descubierto que los carotenoides responsables del color dorado que caracteriza las colonias de *S. aureus* también juegan un papel importante en la virulencia de estas cepas y que interrumpiendo la síntesis de dichos pigmentos, la

bacteria disminuye su patogenicidad (193), por lo que estos carotenoides pueden ser objeto de nuevas terapias antimicrobianas frente a infecciones causadas por *S. aureus*. En el caso de *S. epidermidis* se ha descubierto que la producción de bacteriocinas les confiere cierta ventaja sobre otros microorganismos a la hora de colonizar los tejidos humanos, por lo que dichos compuestos también podrían tomarse como posibles dianas para el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas en el tratamiento de infecciones asociadas a implantes causadas por estos microorganismos (194). Finalmente, otra posible alternativa que se ha planteado en diversos estudios experimentales es la desestructuración de la matriz de la biopelícula por medio de F-actina o desoxirribonucleasas (195).

Además de todas estas posibles estrategias en cuanto al abordaje de estas infecciones, existe otra aproximación. Se trata de aquella enfocada a las modificaciones de los biomateriales. En este sentido, la nanotecnología ha permitido el desarrollo de multitud de estudios y posibilidades, basados tanto en la modificación física (rugosidad, porosidad, etc.) como química (aleaciones, antioxidantes, etc.) del material (196-198), con el objetivo de disminuir la adhesión bacteriana, evitando la formación de una biopelícula sobre su superficie.

Además de la modificación en la superficie o en la estructura, también se ha propuesto la utilización de antibióticos, proteínas y otras moléculas o compuestos para cubrir el biomaterial o para ser liberados desde los mismos.

Proteínas como la heparina o la albúmina o el ácido hialurónico han sido estudiados con buenos resultados (199, 200). También existen estudios con antisépticos como la

clorhexidina o los compuestos de amonio cuaternario, aunque estos presentan un problema de toxicidad en las células del huésped (22).

En el tratamiento de las infecciones asociadas a material ortopédico es necesario que se alcance una concentración adecuada del antimicrobiano en el foco de infección. Junto al uso sistémico de esos compuestos, la administración *in situ* de antimicrobianos se ha propuesto como una posible estrategia de gran utilidad en el tratamiento de estas infecciones (201). Esta posibilidad podría incrementar la eficacia del tratamiento y disminuir de manera significativa la aparición de los efectos secundarios más frecuentes. Además, estos antibióticos pueden producir efectos secundarios de gravedad si son administrados a elevada concentración de manera sistémica (106), por ello son necesarias otras estrategias que minimicen estos efectos pero a su vez que consigan alcanzar una concentración adecuada en el foco de infección.

Con este propósito, a menudo se utilizan diversos mecanismos de liberación local de antibióticos. Algunos de estos sistemas, como por ejemplo el polimetilmetacrilato impregnado con antibiótico se han utilizado durante muchos años como espaciador o durante la fijación de componentes de artroplastia (202). No obstante, estos materiales no se integran en el hueso y requieren ser retirados tras la infección. Otro problema añadido es la alta temperatura que se genera durante la polimerización del cemento, lo que limita la elección del antibiótico en cuestión.

Durante varios años se han estudiado los materiales mesoporosos como sistemas de liberación de antibióticos, con resultados muy prometedores (203). Su gran superficie, junto con el tamaño de los poros (2-50 nm) permite una alta capacidad de carga de fármaco. Además, la distribución ordenada de estos poros favorece la distribución

homogénea del fármaco tanto en la etapa de carga como en la liberación. En consecuencia, estos materiales proporcionan una excelente matriz para portar diferentes biomoléculas. Varios biomateriales de sílice mesoporosos han sido estudiados, como MCM-48, FDU-5 y MCF (203, 204). Estos biomateriales se caracterizan por ser térmica y químicamente estables, no tóxicos y biocompatibles (205).

Diversos estudios demuestran la utilidad de las matrices mesoporosas, no sólo como vehículo de liberación de antibióticos (206, 207), sino también mediante la unión en superficie de péptidos que estimulan la actividad de los osteoblastos y favorece la integración en el tejido óseo (208, 209). La integración en el tejido es muy importante, ya que evitaría una segunda intervención quirúrgica para extraer el material, evitando todos los inconvenientes que ello conlleva. Además, la superficie de dichos materiales cerámicos puede ser modificada mediante un proceso de funcionalización, que implica la adición de distintos grupos químicos en su superficie, lo que le lleva a un control de las propiedades químicas de estas biocerámicas.

En el presente estudio se analizó el biomaterial mesoporoso de sílice SBA-15. Existen estudios previos que demuestran su eficacia como sistema de liberación de amoxicilina, gentamicina o eritromicina (210-212). En este caso se ha querido analizar su capacidad como sistema de liberación de tres antibióticos comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones óseas, en particular en las asociadas a implantes: rifampicina, vancomicina y linezolid, tanto de manera individual como en combinación. La combinación de antibióticos es esencial para evitar el desarrollo de resistencias y la obtención de efectos sinérgicos (106). La actividad de los tres antibióticos seleccionados frente a estafilococos ha sido ampliamente demostrada y las combinaciones entre

rifampicina y vancomicina, así como rifampicina y linezolid han sido ampliamente estudiadas, siendo estas no antagónicas (213-215).

En el presente trabajo se ha confirmado la eficacia del material mesoporoso de sílice SBA-15 como sistema de liberación con rifampicina, vancomicina y linezolid, tanto de manera individual como en combinación.

Los resultados obtenidos demuestran que la mayor parte del antibiótico contenido en las piezas de SBA-15 es liberado en los primeros estadios del experimento. Esto significa que una vez que el biomaterial haya sido implantado podría alcanzarse rápidamente una concentración muy elevada de antibiótico, con concentraciones muy por encima de los puntos de corte para estos compuestos.

Por ello, los resultados aquí expuestos indican que el material SBA-15 podría ser un sustrato altamente flexible para su utilización como sistema de liberación de antibióticos, aunque se necesitan más estudios al respecto antes de su posible utilización *in vivo* con el objetivo de modular la liberación de antibióticos a la máxima dosis posible. Los datos obtenidos son muy positivos, teniendo en cuenta los puntos de corte para *Staphylococcus* sp. (0,064-0,5 mg/L para rifampicina, 2 mg/L para vancomicina y 4 mg/L para linezolid) (126) y los datos de liberación y actividad, mayores que dichos puntos de corte en todos los casos.

El antibiótico con una mejor actividad tras el proceso fue rifampicina, con una concentración activa de 96,14 mg/L, seguido de linezolid, con 7,2 mg/L y vancomicina, con 5,5 mg/L a las 24 horas. Los resultados monitorizados por HPLC fueron muy similares tanto en los experimentos de liberación individual como en combinación. Este hecho es muy interesante, puesto que permitiría la posibilidad de aplicar una terapia

combinada en el mismo material implantable. En particular, estos resultados sugieren la posibilidad, en caso de ser necesario, de seleccionar los antibióticos en función de la sensibilidad individual de la cepa causante de la infección, permitiendo la aplicación de un tratamiento individualizado, mientras que el polimetilmetacrilato comercializado no permite esa posibilidad, ya que no puede ser modificado.

Las mediciones de actividad del antibiótico tras el proceso de carga y liberación mostraron que ésta es variable según el antibiótico del que se trate, y menor que la concentración detectada por HPLC para vancomicina y linezolid. Curiosamente, la actividad biológica de vancomicina disminuyó levemente (de 7,1 mg/L en HPLC a 5,5 mg/L por el método biológico), a diferencia del linezolid, cuya actividad disminuyó de manera notable (de 30 mg/L en HPLC a 7,2 mg/L). Este hecho podría deberse a una posible interacción entre la estructura del biomaterial SBA-15 y la molécula de linezolid en alguna manera desconocida hasta el momento, hecho que debe ser estudiado en un futuro.

A pesar de ello, este trabajo muestra la importancia del estudio tanto de la liberación desde el punto de vista químico (medida por HPLC) como de su actividad biológica, ya que pueden producirse diferencias entre los valores obtenidos mediante ambos métodos, y medida de la actividad es esencial para poder evaluar apropiadamente la eficacia real del antibiótico liberado.

Estos resultados abren una nueva perspectiva en el tratamiento de las infecciones osteoarticulares y corrobora el potencial de los biomateriales en aplicaciones clínicas, aunque se necesitan más estudios con el objetivo de diseñar nuevas biocerámicas que respondan a necesidades específicas en la práctica clínica y para optimizar estos

sistemas. Además, se necesitan más estudios para conocer con exactitud la cantidad máxima de fármaco que puede albergar este biomaterial y evaluar nuevas combinaciones antes de que pueda realizarse un ensayo *in vivo* para evaluar su utilidad en el tratamiento de las infecciones osteoarticulares.. En futuros estudios podrían incluirse otros antimicrobianos y compuestos que actúen sobre la estructura de las biopelículas y el desarrollo de la infección, analizados en los estudios expuestos y otros similares.

Además, la realización del protocolo es relativamente sencilla y puede ser utilizado para la carga y liberación de antibióticos específicos frente al patógeno que cause la infección en cada paciente de manera individual. Para obtener mejores resultados también habría que considerar la posibilidad de funcionalizar el biomaterial antes de cargar las matrices con el fármaco deseado para obtener una liberación del antibiótico más controlada y alcanzar altas concentraciones durante periodos más prolongados.

Hasta el momento no se ha encontrado un recubrimiento o modificación capaz de evitar por completo la adhesión bacteriana, aunque muchos de los métodos desarrollados consiguen disminuir significativamente el número de bacterias adheridas (22).

Otra posibilidad que se ha propuesto recientemente en la lucha frente a las infecciones asociadas a implantes es la utilización de vacunas con el fin de evitar las infecciones causadas por biopelículas estafilocócicas (89). Este hecho es objeto de discusión desde hace unos años. Algunos autores han propuesto vacunas contra el polisacárido extracelular (216), proteínas de superficie (217, 218) o con combinaciones de diferentes moléculas (219).

En definitiva, las infecciones asociadas a biomateriales ortopédicos son hoy en día una de las complicaciones más temidas en medicina. Teniendo en cuenta todos los aspectos anteriormente citados, un mayor conocimiento de las biopelículas ayudará a mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento. El estudio de nuevos métodos de diagnóstico, el desarrollo de nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas y con actividad frente a biopelículas, el desarrollo de métodos estandarizados para evaluar la sensibilidad individual de éstas, junto con el desarrollo de nuevos biomateriales inteligentes que minimicen el riesgo de infección, ayudará a disminuir la prevalencia de estas infecciones en un futuro.

6. CONCLUSIONES

1. La utilización del kit comercial *GenoType BC* combinado con la técnica de sonicación permitió incrementar la sensibilidad en el diagnóstico de muestras procedentes de pacientes con diagnóstico clínico de infección en un 10% respecto a aquellas detectadas sólo mediante cultivo y sonicación en los casos de infección asociada a prótesis articular. Sin embargo, la detección molecular de microorganismos en las muestras sin diagnóstico clínico de infección sigue siendo un desafío respecto a la interpretación de los resultados, ya que en este trabajo se detectaron como positivas el 18,1 % de las muestras consideradas sin infección en un inicio.
2. Tras estudiar mediante distintos métodos la capacidad formadora de biopelícula en cepas clínicas de *S. aureus* y *S. epidermidis* se determinó que todas las cepas estudiadas son formadoras de biopelícula, ya que mostraron resultado positivo en al menos una de las técnicas utilizadas. La técnica de Stepanovic resultó ser la más sensible, con un porcentaje de detección del 93,8%, seguida por el test MtP (68,8 %) y por CLSM (56,3%). Por otra parte, la detección de los genes *ica* no parece ser un indicativo determinante de la capacidad para formar una biopelícula. Observando los resultados obtenidos en el estudio de formación de biopelícula en cepas de *Staphylococcus* sp. aisladas de casos de infección, queda demostrada la necesidad de recurrir a diversos tipos de técnicas, tanto genotípicas como fenotípicas para la completa detección del potencial de una cepa bacteriana para formar una biopelícula.

3. Observando los datos de CMI y CMB obtenidos en el estudio de sensibilidad en bacterias plantónicas, los antibióticos con mejores resultados fueron tigeciclina, daptomicina, y linezolid, mostrando una alta actividad *in vitro* frente a la mayoría de las cepas de estafilococos estudiadas y sin casos de resistencia.
4. En el estudio de sensibilidad en biopelículas los dos antibióticos con mejor actividad fueron rifampicina y tigeciclina, con valores de CMEB ligeramente inferiores al resto de los antibióticos. A pesar de ello, los resultados demostraron que ninguno de los antibióticos seleccionados fue totalmente efectivo en la erradicación de biopelículas, con datos de CMEB muy superiores a los de CMI, lo que demuestra la mayor resistencia de las biopelículas a los distintos antimicrobianos.
5. Respecto a las combinaciones de antibióticos con NAC, en el caso de las cepas de *S. aureus* los resultados fueron muy homogéneos, y la adición de NAC no demostró ejercer un claro efecto sobre la susceptibilidad de las biopelículas. En el caso de *S. epidermidis* los resultados fueron cepa dependiente. La combinación de NAC con rifampicina, tigeciclina y ciprofloxacino incrementó la CMEB en algunas cepas. Por el contrario, se observó una ligera disminución al combinar ese mismo compuesto con cloxacilina, daptomicina y fosfomicina.
6. La combinación de eritromicina a concentración subinhibitoria con los mismos antibióticos sólo resultó satisfactoria en ciertas cepas de *S.*

epidermidis. Únicamente una cepa de esta especie vio disminuida su CMEB en prácticamente todos los casos al realizar las combinaciones con ambos compuestos. Por otra parte, las combinaciones resultaron indiferentes para *S. aureus*.

7. Los resultados obtenidos en el ensayo con el péptido *RIP* no demostraron la capacidad de este compuesto para inhibir de manera significativa la formación de biopelícula en las cepas analizadas, ya que no se observaron diferencias significativas en las D.O. obtenidas con adición del péptido y sin él.
8. El estudio de la cerámica mesoporosa de sílice SBA-15 demostró que se trata de un biomaterial con un gran potencial en cuanto a su utilización como vehículo de liberación de rifampicina, vancomicina y linezolid, tanto de manera individual como en combinación, ya que todos los antibióticos alcanzaron concentraciones de liberación por encima de los puntos de corte. El antibiótico que se mantuvo más activo tras el proceso fue rifampicina, con una concentración activa equivalente a 96,14 mg/L a las 24 horas. En este estudio se demostró la importancia del análisis tanto de la liberación desde el punto de vista químico, medida por HPLC, como de la actividad biológica para poder evaluar apropiadamente la eficacia real del antibiótico liberado.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ratner B.D. HAS, Schoen F.J., Lemons J.E. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. Biomaterials Science A introduction to Materials in Medicine. 3^a ed: Elsevier; 2013. p. 1-9.
2. Gomez-Barrena E, Padilla-Eguiluz NG, Garcia-Rey E, Cordero-Ampuero J, Garcia-Cimbrelo E. Factors influencing regional variability in the rate of total knee arthroplasty. *Knee*. 2013.
3. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1422-9.
4. Kurtz SM, Lau E, Schmier J, Ong KL, Zhao K, Parvizi J. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty*. 2008;23(7):984-91.
5. Singer PJ, Seligson D. What's in a nail? *J Orthop Trauma*. 1990;4(3):331-5.
6. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Rev Mol Diagn*. 2002;2(5):478-84.
7. Bauer TW, Parvizi J, Kobayashi N, Krebs V. Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(4):869-82.
8. Marín M EJ, Meseguer MA, Sánchez-Somolinos M. Microbiological diagnosis of bone-joint infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(8):7.
9. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005;28(11):1062-8.
10. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep*. 2008;10(5):394-403.
11. Burger RR, Basch T, Hopson CN. Implant salvage in infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1991(273):105-12.
12. Moyad TF, Thornhill T, Estok D. Evaluation and management of the infected total hip and knee. *Orthopedics*. 2008;31(6):581-8; quiz 9-90.
13. Tattevin P, Cremieux AC, Pottier P, Hutten D, Carbon C. Prosthetic joint infection: when can prosthesis salvage be considered? *Clin Infect Dis*. 1999;29(2):292-5.
14. Cataldo MA, Petrosillo N, Cipriani M, Cauda R, Tacconelli E. Prosthetic joint infection: recent developments in diagnosis and management. *J Infect*. 2010;61(6):443-8.
15. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(4):349-56.

16. Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis*. 2001;33 Suppl 2:S94-106.
17. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am*. 1996;78(4):512-23.
18. Arciola CR, An YH, Campoccia D, Donati ME, Montanaro L. Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int J Artif Organs*. 2005;28(11):1091-100.
19. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1567-72.
20. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med*. 2009;361(8):787-94.
21. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):277-81.
22. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury*. 2006;37 Suppl 2:S3-14.
23. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004;8:37-57.
24. Rimondini L, Fini M, Giardino R. The microbial infection of biomaterials: A challenge for clinicians and researchers. A short review. *J Appl Biomater Biomech*. 2005;3(1):1-10.
25. Mansson M NA, Kjærulff L, Gotfredsen CH, Wietz M, Ingmer H, Gram L, Larsen TO. Inhibition of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by novel depsipeptides from a marine photobacterium. *Mar Drugs* 2011;9(12):16.
26. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(17-18):243-51.
27. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma*. 1984;24(8):742-6.
28. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*. 2006;37 Suppl 2:S59-66.

29. Murdoch DR, Roberts SA, Fowler Jr VG, Jr., Shah MA, Taylor SL, Morris AJ, et al. Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2001;32(4):647-9.
30. Ochsner PE, Hailemariam S. Histology of osteosynthesis associated bone infection. *Injury.* 2006;37 Suppl 2:S49-58.
31. Esteban J. P-JC, Pérez-Tanoira R., Gómez-Barrena E. . Microbiological diagnosis of prosthetic joint infection. In: R. T, editor. *Infected total joint arthroplasty.* London: Springer-Verlag; 2012. p. 165-79.
32. Gomez E. PR. Laboratory diagnosis of prosthetic joint infection, part 1. *Clin Microbiol Newslett.* 2011;33(8):6.
33. Trampuz A, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. Effect of gamma irradiation on viability and DNA of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2006;55(Pt 9):1271-5.
34. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wust J, Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1208-14.
35. Dora C, Altwegg M, Gerber C, Bottger EC, Zbinden R. Evaluation of conventional microbiological procedures and molecular genetic techniques for diagnosis of infections in patients with implanted orthopedic devices. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):824-5.
36. Esteban J, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R. Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):488-92.
37. Piper KE. JM, Cofield RH., Sperling JW., Sanchez-Sotelo J., Osmon DR., McDowell A., Patrick S., Steckelberg JM., Mandrekar JN., Fernandez Sampedro M., Patel R. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):7.
38. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357(7):654-63.
39. Esteban J, Sandoval E, Cordero-Ampuero J, Molina-Manso D, Ortiz-Perez A, Fernandez-Roblas R, et al. Sonication of intramedullary nails: clinically-related infection and contamination. *Open Orthop J.* 2012;6:255-60.
40. Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, et al. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):628-31.

41. Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1113-9.
42. Fihman V, Hannouche D, Bousson V, Bardin T, Liote F, Raskine L, et al. Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques. *J Infect*. 2007;55(6):510-7.
43. Moojen DJ, Spijkers SN, Schot CS, Nijhof MW, Vogely HC, Fleer A, et al. Identification of orthopaedic infections using broad-range polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(6):1298-305.
44. Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Anderson N, Davis RI, et al. Detection of prosthetic joint biofilm infection using immunological and molecular techniques. *Methods Enzymol*. 1999;310:566-76.
45. Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, Yombi JC, Lecouvet F, Lefevre P, et al. Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Mol Diagn*. 2008;10(6):537-43.
46. Boisrenoult P, Beaufile P. [Infection associated with orthopaedic fixation devices]. *Rev Prat*. 2007;57(9):979-84.
47. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1998;43(3):338-48.
48. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. 1987;237(4822):1588-95.
49. Subbiahdoss G, Grijpma DW, van der Mei HC, Busscher HJ, Kuijer R. Microbial biofilm growth versus tissue integration on biomaterials with different wettabilities and a polymer-brush coating. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(2):533-8.
50. Sherk HH. Posterior exposure of the hip joint. *Clin Orthop Relat Res*. 2004(429):3-5.
51. Subbiahdoss G, Kuijer R, Busscher HJ, van der Mei HC. Mammalian cell growth versus biofilm formation on biomaterial surfaces in an in vitro post-operative contamination model. *Microbiology*. 2010;156(Pt 10):3073-8.
52. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
53. Kolter R, Losick R. One for all and all for one. *Science*. 1998;280(5361):226-7.
54. Costerton JW. The biofilm primer. Berlin: Springer-Verlag; 2007.

55. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108.
56. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011;3(2):55-65.
57. Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(6):547-58.
58. Palmer RJ, Jr. Supragingival and subgingival plaque: paradigm of biofilms. *Compend Contin Educ Dent*. 2010;31(2):104-6, 8, 10 passim; quiz 24, 38.
59. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1466-77.
60. Lasa I, Del Pozo JL, Penades JR, Leiva J. [Bacterial biofilms and infection]. *An Sist Sanit Navar*. 2005;28(2):163-75.
61. Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, Prenna M, Ballarini P, Ripa S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(12):773-81.
62. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1387-92.
63. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:207-28.
64. Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(2):409-14.
65. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*. 2001;35:439-68.
66. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280(5361):295-8.
67. Balaban N, Goldkorn T, Nhan RT, Dang LB, Scott S, Ridgley RM, et al. Autoinducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *Staphylococcus aureus*. *Science*. 1998;280(5362):438-40.
68. El-Azizi MA, SS, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol* 2004;96(5):7.

69. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
70. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 35(4):322-32.
71. Geipel U. Pathogenic organisms in hip joint infections. *Int J Med Sci.* 2009;6(5):234-40.
72. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358(9276):135-8.
73. Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005(437):7-11.
74. Scheleifer KH. BJ. Family VIII. Staphylococcaceae. In: De Vos P. BD, Garrity GM., Castenholz RW., Brenner DJ., Krieg NR., Staley JT., editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes.* 3: The Firmicutes. 2 ed: Springer; 2009. p. 392-426.
75. Vuong C, Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes Infect.* 2002;4(4):481-9.
76. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1367-78.
77. Atlanta, USA: Centers for Disease Control and Prevention [cited 2013]. Available from: <http://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html>.
78. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Trends Microbiol.* 2001;9(10):486-93.
79. von Eiff C. Staphylococcus aureus small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(6):507-10.
80. Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of Staphylococcus epidermidis biofilms on indwelling medical devices. *Int J Artif Organs.* 2005;28(11):1069-78.
81. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. *Trends Microbiol.* 1998;6(12):484-8.
82. Patti JM, Hook M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(5):752-8.
83. Mack D, Haeder M, Siemssen N, Laufs R. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis.* 1996;174(4):881-4.

84. Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5648-55.
85. Sadovskaya I, Chaignon P, Kogan G, Chokr A, Vinogradov E, Jabbouri S. Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;47(1):75-82.
86. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A.* 2005;75(2):408-13.
87. Cafiso V BT, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(12):8.
88. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, et al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int J Med Microbiol.* 2006;296(6):381-8.
89. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555-67.
90. Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem.* 1998;273(29):18586-93.
91. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 1996;20(5):1083-91.
92. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 2004;6(3):269-75.
93. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2004;186(3):722-9.
94. Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Braunstein JB, Silvestri C, et al. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):2226-9.

95. Balaban N, Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, Ghiselli R, Mocchegiani F, et al. Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*. 2003;187(4):625-30.
96. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1645-54.
97. Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, Hanssen AD, Steckelberg JM, Ilstrup DM, et al. *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. *Clin Infect Dis*. 1997;24(5):914-9.
98. Callaghan JJ, Katz RP, Johnston RC. One-stage revision surgery of the infected hip. A minimum 10-year followup study. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(369):139-43.
99. Ure KJ, Amstutz HC, Nasser S, Schmalzried TP. Direct-exchange arthroplasty for the treatment of infection after total hip replacement. An average ten-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(7):961-8.
100. Langlais F. Can we improve the results of revision arthroplasty for infected total hip replacement? *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85(5):637-40.
101. Fisman DN, Reilly DT, Karchmer AW, Goldie SJ. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of 2 management strategies for infected total hip arthroplasty in the elderly. *Clin Infect Dis*. 2001;32(3):419-30.
102. Trebse R, Pisot V, Trampuz A. Treatment of infected retained implants. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87(2):249-56.
103. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA*. 1998;279(19):1537-41.
104. Barberan J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12 Suppl 3:93-101.
105. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res*. 2006;24(1):87-93.
106. Esteban J, Cordero-Ampuero J. Treatment of prosthetic osteoarticular infections. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12(6):899-912.
107. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Roiron R, Groulier P, Raoult D. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. *J Antimicrob Chemother*. 1997;39(2):235-40.

108. Soriano A, Garcia S, Bori G, Almela M, Gallart X, Macule F, et al. Treatment of acute post-surgical infection of joint arthroplasty. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(9):930-3.
109. Widmer AF, Gaechter A, Ochsner PE, Zimmerli W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin Infect Dis.* 1992;14(6):1251-3.
110. Shirtliff ME, Calhoun JH, Mader JT. Comparative evaluation of oral levofloxacin and parenteral nafcillin in the treatment of experimental methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in rabbits. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(2):253-8.
111. Trampuz A, Zimmerli W. Antimicrobial agents in orthopaedic surgery: Prophylaxis and treatment. *Drugs.* 2006;66(8):1089-105.
112. Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Schrenzel J, Lew DP. Comparison of levofloxacin, alatrofloxacin, and vancomycin for prophylaxis and treatment of experimental foreign-body-associated infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1503-9.
113. Stein A, Bataille JF, Drancourt M, Curvale G, Argenson JN, Groulier P, et al. Ambulatory treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus*-infected orthopedic implants with high-dose oral co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole). *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(12):3086-91.
114. Bassetti M, Righi E, Di Biagio A, Rosso R, Beltrame A, Bassetti D. Role of linezolid in the treatment of orthopedic infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005;3(3):343-52.
115. Bassetti M, Vitale F, Melica G, Righi E, Di Biagio A, Molfetta L, et al. Linezolid in the treatment of Gram-positive prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(3):387-90.
116. Carpenter CF, Chambers HF. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis.* 2004;38(7):994-1000.
117. Tedesco KL, Rybak MJ. Daptomycin. *Pharmacotherapy.* 2004;24(1):41-57.
118. Labthavikul P, Petersen PJ, Bradford PA. In vitro activity of tigecycline against *Staphylococcus epidermidis* growing in an adherent-cell biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3967-9.
119. Gentry LO. Review of quinolones in the treatment of infections of the skin and skin structure. *J Antimicrob Chemother.* 1991;28 Suppl C:97-110.
120. Dumler JS, J.M. Janda, A. von Graevenitz. Bacteriology. In: P.R. Murray EJB, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenover, editor. *Manual of clinical microbiology.* 1. 8 ed. Washington, DC: ASM Press; 2003.

121. Ausubel F.M. BR, Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. editor. Short Protocols in Molecular Biology. 2 ed. New York: John Wiley & Sons.; 1992.
122. Christensen GD. SW, Younger JJ., Baddour LM., Barrett FF., Melton DM., Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1986;22(6):11.
123. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(6):2950-8.
124. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007;115(8):891-9.
125. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-first informational supplement. M100-S21 Vol 31 No 12012.
126. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 202012.
127. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1771-6.
128. Zhao D, Huo Q, Feng J, Chmelka B, Stucky G. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J Am Chem Soc.* 1998;120(24):6024-36.
129. del Pozo JL. PR. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(2):6.
130. Clarke MT. RC, Lee PT., Gray J., Keene GS., Rushton N. Polymerase chain reaction can detect bacterial DNA in aseptically loose total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 427:6.
131. Dempsey KE, Riggio MP, Lennon A, Hannah VE, Ramage G, Allan D, et al. Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(3):R46.
132. Levine MJ, Mariani BA, Tuan RS, Booth RE, Jr. Molecular genetic diagnosis of infected total joint arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1995;10(1):93-4.
133. Mariani BD, Tuan RS. Advances in the diagnosis of infection in prosthetic joint implants. *Mol Med Today.* 1998;4(5):207-13.

134. Riggio MP, Dempsey KE, Lennon A, Allan D, Ramage G, Bagg J. Molecular detection of transcriptionally active bacteria from failed prosthetic hip joints removed during revision arthroplasty. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(7):823-34.
135. Kobayashi H. HG, Tuohy MJ., Knothe U., Procop GW., Bauer TW. Bilateral periprosthetic joint infection caused by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, and identification of *Salmonella* sp using molecular techniques. *. Int J Infect Dis*. 2009;13(6):4.
136. Selan L, Passariello C, Rizzo L, Varesi P, Speziale F, Renzini G, et al. Diagnosis of vascular graft infections with antibodies against staphylococcal slime antigens. *Lancet*. 2002;359(9324):2166-8.
137. Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS. Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res*. 2005(437):25-30.
138. Bjerkan G, Witso E, Nor A, Viset T, Loseth K, Lydersen S, et al. A comprehensive microbiological evaluation of fifty-four patients undergoing revision surgery due to prosthetic joint loosening. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 4):572-81.
139. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Osmon DR. Prosthetic joint infection due to *Mycobacterium tuberculosis*: a case series and review of the literature. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 1998;27(3):219-27.
140. Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods*. 1999;37(1):77-86.
141. Costa MO, Beltrame CO, Ferreira FA, Botelho AM, Lima NC, Souza RC, et al. Complete Genome Sequence of a Variant of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 Lineage, Strain BMB9393, Displaying Superior Ability To Accumulate ica-Independent Biofilm. *Genome Announc*. 2013;1(4).
142. Ferreira FA, Souza RR, Bonelli RR, Americo MA, Fracalanza SE, Figueiredo AM. Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Microbiol Methods*. 2012;88(3):393-8.
143. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1973-6.
144. Juarez-Verdayes MA, Ramon-Perez ML, Flores-Paez LA, Camarillo-Marquez O, Zenteno JC, Jan-Roblero J, et al. *Staphylococcus epidermidis* with the icaA(-)/icaD(-)/IS256(-) genotype and protein or protein/extracellular-DNA biofilm is frequent in ocular infections. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 10):1579-87.

145. Pratten J, Foster SJ, Chan PF, Wilson M, Nair SP. Staphylococcus aureus accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes Infect.* 2001;3(8):633-7.
146. Shinji H, Yosizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S, Seki K, et al. Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by Staphylococcus aureus. *Infect Immun.* 2011;79(6):2215-23.
147. Kang M, Ko YP, Liang X, Ross CL, Liu Q, Murray BE, et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J Biol Chem.* 2013;288(28):20520-31.
148. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):222-35.
149. Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12 Suppl 1:3-8.
150. Schafer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis.* 2008;47(11):1403-9.
151. Vaudaux P, Kelley WL, Lew DP. Staphylococcus aureus small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat. *Clin Infect Dis.* 2006;43(8):968-70.
152. Kourbatova EV, Halvosa JS, King MD, Ray SM, White N, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections. *Am J Infect Control.* 2005;33(7):385-91.
153. Pantosti A, Venditti M. What is MRSA? *Eur Respir J.* 2009;34(5):1190-6.
154. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1620-7.
155. Darley ES, MacGowan AP. Antibiotic treatment of gram-positive bone and joint infections. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(6):928-35.
156. Percival SL, HK, Malic S, Thomas DW, Williams DW. Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen* 2011;19(1):9.
157. Ruef C. Epidemiology and clinical impact of glycopeptide resistance in Staphylococcus aureus. *Infection.* 2004;32(6):315-27.

158. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):430-8.
159. Srinivasan A, Uppuluri P, Lopez-Ribot J, Ramasubramanian AK. Development of a high-throughput *Candida albicans* biofilm chip. *PLoS One.* 2011;6(4):e19036.
160. van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The Clinical Significance of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012;54(6):755-71.
161. Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):158-68.
162. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Zannier A, Curvale G, Raoult D. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(6):1214-8.
163. Picazo JJ, Betriu C, Rodriguez-Avial I, Culebras E, Lopez F, Gomez M. [Comparative activity of daptomycin against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(1):13-6.
164. Rice DA, Mendez-Vigo L. Daptomycin in bone and joint infections: a review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009;129(11):1495-504.
165. Sader HS, Jones RN. The activity of daptomycin against wild-type *Staphylococcus aureus* and strains with reduced susceptibility to vancomycin. *Clin Infect Dis.* 2006;43(6):798-9; author reply 9-800.
166. Alhajlan M, Alhariri M, Omri A. Efficacy and safety of liposomal clarithromycin and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2694-704.
167. Pesciaroli L, Petruccioli M, Fedi S, Firrincieli A, Federici F, D'Annibale A. Characterization of *Pleurotus ostreatus* biofilms by using the Calgary biofilm device. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(19):6083-92.
168. Santopolo L, Marchi E, Frediani L, Decorosi F, Viti C, Giovannetti L. A novel approach combining the Calgary Biofilm Device and Phenotype MicroArray for the characterization of the chemical sensitivity of bacterial biofilms. *Biofouling.* 2012;28(9):1023-32.
169. Coraca-Huber DC, Fille M, Hausdorfer J, Pfaller K, Nogler M. Evaluation of MBEC-HTP biofilm model for studies of implant associated infections. *J Orthop Res.* 2012;30(7):1176-80.
170. Raad I, Hanna H, Jiang Y, Dvorak T, Reitzel R, Chaiban G, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-

resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(5):1656-60.

171. Sepandj F, Ceri H, Gibb A, Read R, Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Perit Dial Int.* 2004;24(1):65-7.

172. El Helou OC, Berbari EF, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Razonable RR, Sia IG, et al. Efficacy and safety of rifampin containing regimen for staphylococcal prosthetic joint infections treated with debridement and retention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(8):961-7.

173. Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezeque H, Beltrand E, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2011;53(4):334-40.

174. Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22 Suppl 2:95-100.

175. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):4814-22.

176. Tateda K, Hirakata Y, Furuya N, Ohno A, Yamaguchi K. Effects of sub-MICs of erythromycin and other macrolide antibiotics on serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(4):675-80.

177. Wozniak DJ, Keyser R. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest.* 2004;125(2 Suppl):62S-9S; quiz 9S.

178. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. *Staphylococcus epidermidis* biofilms control by N-acetylcysteine and rifampicin. *Am J Ther.* 2013;20(4):322-8.

179. El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella HA, Abd El-Baky RM, Gad GF. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol J Microbiol.* 2009;58(3):261-7.

180. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1556-8.

181. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013.

182. Streit JM, Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Dalbavancin activity against selected populations of antimicrobial-resistant Gram-positive pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53(4):307-10.
183. Murphy CK, Mullin S, Osburne MS, van Duzer J, Siedlecki J, Yu X, et al. In vitro activity of novel rifamycins against rifamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):827-34.
184. Robertson GT, Bonventre EJ, Doyle TB, Du Q, Duncan L, Morris TW, et al. In vitro evaluation of CBR-2092, a novel rifamycin-quinolone hybrid antibiotic: microbiology profiling studies with staphylococci and streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2324-34.
185. Sincak CA, SJ. Iclaprim, a novel diaminopyrimidine for the treatment of resistant gram-positive infections. *Ann Pharmacother.* 2009;43(6):8.
186. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3648-63.
187. Bodini SF, Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49(5):551-5.
188. Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps RK, Christensen KB, Jensen PO, et al. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology.* 2005;151(Pt 5):1325-40.
189. Song Z KK, Wu H, Maricic N, Ramalingam B, Priestap H, Schneper L, Quirke JM, Høiby N, Mathee K. *Panax ginseng* has anti-infective activity against opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing, a bacterial communication process critical for establishing infection. *Phytomedicine.* 2010 17(13):7.
190. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2655-61.
191. Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol.* 2003;185(16):4693-8.
192. Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3407-14.
193. Liu GY EA, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.* 2005;202(2):7.

194. Kocianova S, Vuong C, Yao Y, Voyich JM, Fischer ER, DeLeo FR, et al. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest*. 2005;115(3):688-94.
195. Tolker-Nielsen T HN. Extracellular DNA and F-actin as targets in antibiofilm cystic fibrosis therapy. *Future Microbiol*. 2009;4(6):3.
196. Del Prado G, Terriza A, Ortiz-Perez A, Molina-Manso D, Mahillo I, Yubero F, et al. DLC coatings for UHMWPE: Relationship between bacterial adherence and surface properties. *J Biomed Mater Res A*. 2012.
197. Pérez-Jorge C CA, Arenas MA, Pérez-Tanoira R, Matykina E, de Damborenea JJ, Gómez-Barrena E, Esteban J. In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti-6Al-4V alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(7):10.
198. Pérez-Tanoira R P-JC, Endrino JL, Gómez-Barrena E, Horwat D, Pierson JF, Esteban J. Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver Islands. *J Biomed Mater Res A* 2012;100(6):9.
199. Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kivilahti J, Kononen M, Jero J. Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin. *Otol Neurotol*. 2005;26(3):380-4.
200. Nagaoka S, Kawakami H. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation by a heparinized hydrophilic polymer. *ASAIO J*. 1995;41(3):M365-8.
201. Lewis G. Properties of antibiotic-loaded acrylic bone cements for use in cemented arthroplasties: a state-of-the-art review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;89B(2):558-74.
202. Nelson CL. The current status of material used for depot delivery of drugs. *Clin Orthop Relat Res*. 2004(427):72-8.
203. Vallet-Regi M, Balas F, Colilla M, Manzano M. Drug confinement and delivery in ceramic implants. *Drug Metab Lett*. 2007;1(1):37-40.
204. Vallet-Regi M, Ruiz-Hernandez E. Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine. *Adv Mater*. 2011;23(44):5177-218.
205. Lu J, Liong M, Li Z, Zink JJ, Tamanoi F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small*. 2010;6(16):1794-805.
206. Izquierdo-Barba I, Vallet-Regi M, Kupferschmidt N, Terasaki O, Schmidtchen A, Malmsten M. Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. *Biomaterials*. 2009;30(29):5729-36.

207. Li Z, Su K, Cheng B, Deng Y. Organically modified MCM-type material preparation and its usage in controlled amoxicillin delivery. *J Colloid Interface Sci.* 2010;342(2):607-13.
208. Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regi M, Gomez-Barrena E, et al. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater.* 2010;6(3):797-803.
209. Trejo CG, Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Dapia S, et al. The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model. *Biomaterials.* 2010;31(33):8564-73.
210. Doadrio AL, Sousa EM, Doadrio JC, Perez Pariente J, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regi M. Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery. *J Control Release.* 2004;97(1):125-32.
211. Doadrio JC, SE, Izquierdo-Barba I, Doadrio AL, Perez-Pariente J, Vallet-Regi M. Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern. *Journal of Materials Chemistry* 2006;16(5):5.
212. Vallet-Regi M, DJ, Doadrio AL, Izquierdo-Barba I, Perez-Pariente J. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. *Solid State Ionics* 2004;172(1-4):5.
213. Silva LV, Araujo MT, Santos KR, Nunes AP. Evaluation of the synergistic potential of vancomycin combined with other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(1):44-50.
214. Tsuji BT, Rybak MJ. Etest synergy testing of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* demonstrating heterogeneous resistance to vancomycin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54(1):73-7.
215. Vergidis P, Rouse MS, Euba G, Karau MJ, Schmidt SM, Mandrekar JN, et al. Treatment with linezolid or vancomycin in combination with rifampin is effective in an animal model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* foreign body osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1182-6.
216. Kelly-Quintos C, Cavacini LA, Posner MR, Goldmann D, Pier GB. Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine. *Infect Immun.* 2006;74(5):2742-50.
217. Rennermalm A, Li YH, Bohaufs L, Jarstrand C, Brauner A, Brennan FR, et al. Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. *Vaccine.* 2001;19(25-26):3376-83.

218. Shahrooei M, Hira V, Khodaparast L, Stijlemans B, Kucharikova S, Burghout P, et al. Vaccination with SesC decreases *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Infect Immun*. 2012;80(10):3660-8.
219. Brady RA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infect Immun* 2011;79(4):7.

ANEXO